

TENT COOPERATION TRE Y

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 28 September 2000 (28.09.00)	
International application No. PCT/JP00/00245	Applicant's or agent's file reference 1179
International filing date (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)	Priority date (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)
Applicant HASHIMOTO, Shin-ichi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 August 2000 (18.08.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Diana Nissen Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

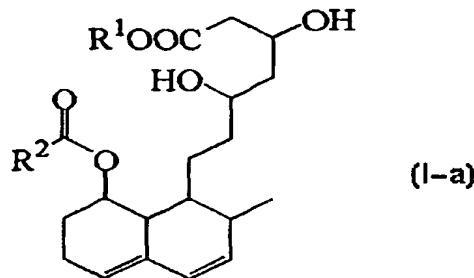
世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12P 7/62, 17/06 // (C12P 7/62, C12R 1:32) (C12P 7/62, C12R 1:15) (C12P 7/62, C12R 1:13) (C12P 7/62, C12R 1:01) (C12P 7/62, C12R 1:06) (C12P 7/62, C12R 1:265) (C12P 7/62, C12R 1:34)	A1	(11) 国際公開番号 WO00/43533 (43) 国際公開日 2000年7月27日(27.07.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00245		
(22) 国際出願日 2000年1月20日(20.01.00)		
(30) 優先権データ 特願平11/12392 1999年1月20日(20.01.99)	JP	(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 橋本信一(HASHIMOTO, Shin-ichi)[JP/JP] 米谷良之(YONETANI, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP) 尾崎明夫(OZAKI, Akio)[JP/JP] 〒747-8522 山口県防府市協和町1番1号 協和醸酵工業株式会社 技術研究所内 Yamaguchi, (JP)		

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS

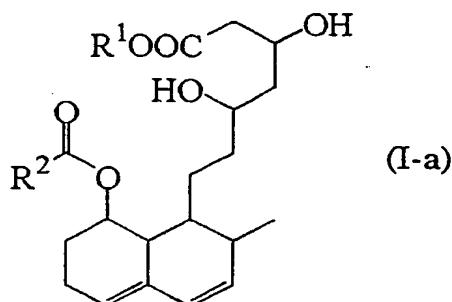
(54) 発明の名称 HMG-CoA レダクターゼ阻害剤の製造法



(57) Abstract

A process for producing compounds (II-a) or compounds (II-b), which are respectively hydroxylated products of compounds represented by general formula (I-a) (hereinafter referred to as the compounds (I-a) or closed lactone derivatives thereof (hereinafter referred to as the compounds (I-b)). In formula (I-a) R¹ represents hydrogen, optionally substituted alkyl or an alkali metal; and R² represents optionally substituted alkyl or optionally substituted aryl. This process is characterized by treating in an aqueous medium the compounds (I-a) or (I-b) with an enzyme source comprising a microorganism having an activity of hydroxylating the compounds (I-a) or (I-b), having no sporulability and showing no hyphal growth, or an optionally processed culture of the microorganism and collecting the compounds (II-a) or (II-b) from the aqueous medium.

本願発明は、一般式(I-a)



(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(I-a)という]またはその閉鎖ラクトン体[以下、化合物(I-b)という]を水酸化する活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させ、該水性媒体から化合物(I-a)または化合物(I-b)の水酸化物[以下、化合物(II-a)または化合物(II-b)という]を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スードン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シェラ・レオネ
BA	ボズニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スウェーデン
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴー
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	共和国		TT	トリニダッド・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジール	YU	ユーゴースラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チエコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

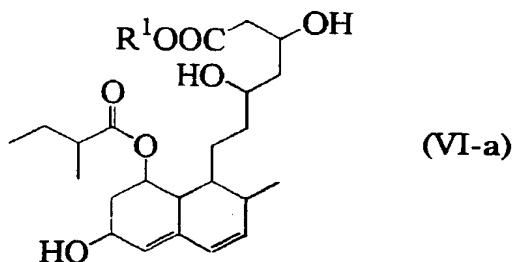
HMG-CoAレダクターゼ阻害剤の製造法

技術分野

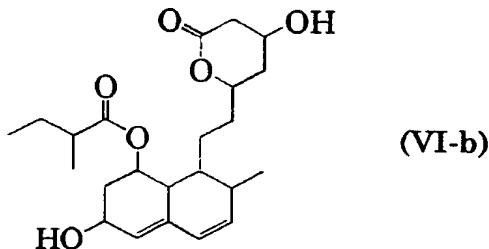
本願発明はヒドロキシメチルグルタリルCoA(HMG-CoA)レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物の製造法に関する。

背景技術

一般式(VI-a)

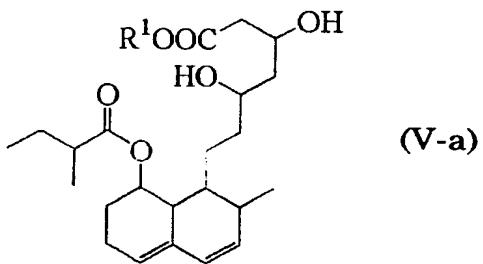


(式中、R¹は水素原子またはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(VI-a)という〕または一般式(VI-b)

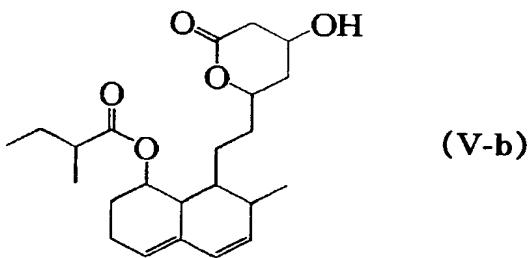


で表される、化合物(VI-a)のラクトン体〔以下、化合物(VI-b)という〕は、HMG-CoAレダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を示すことが知られている〔ザ・ジャーナル・オブ・アンチビオチクス(The Journal of Antibiotics, 29, 1346(1976))〕。

微生物によって、一般式(VI-a)



(式中、R¹は水素原子またはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(V-a)という〕または一般式(V-b)



で表される、化合物(V-a)のラクトン体〔以下、化合物(V-b)とういう〕から化合物(VI-a)または化合物(VI-b)を生成する方法に関しては既に幾つかの報告がある。

即ち、特開昭57-50894には糸状菌を用いる方法が、特開平7-184670およびWO96/40863には放線菌を用いる方法が、また特許第2672551号には遺伝子組換え放線菌を使用した方法が述べられている。しかし、よく知られているように糸状菌や放線菌は菌糸を伸ばして成長するため、発酵槽で増殖させると培養液の粘度が上昇する。このため培養液中の酸素が不足しやすく、また培養液が不均一になるため反応効率が低下しやすい。この酸素不足を解消し、培養液を均一に保つためには、発酵槽の攪拌速度を上げなければならないが、攪拌速度を上げると菌糸が剪断され、微生物の活性が低下しやすい〔発酵工学の基礎、p169~190、P. F. Stansbury, A. Whitaker著、学会出版センター(1988)〕。

さらに、上記放線菌および糸状菌はいずれも胞子を形成する能力を有する。胞子は菌体に比べはるかに飛散しやすい上、栄養細胞が容易に死滅するような条件下でも生存できる能力があるため、培養、精製工程での微生物汚染源となりやすい。

発明の開示

本願発明の目的は、HMG-CoAレダクターゼを阻害し、血清コレステロール

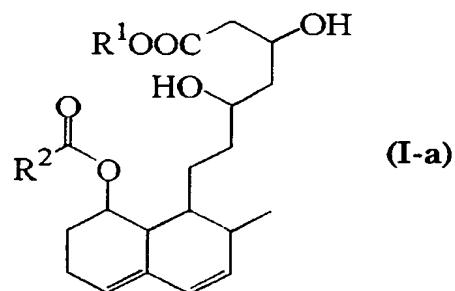
の低下作用等を有する化合物の工業的に有利な製造法を提供することにある。

本願発明者らは、水酸化活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物により化合物(V-a)または化合物(V-b)の水酸化を行うことができれば、胞子飛散による製造工程での微生物汚染や菌糸形成による培養液の不均一化にともなう反応効率の低下等の不都合を回避でき、工業的に有利であると考え、鋭意検討した結果、本願発明を完成するに至った。

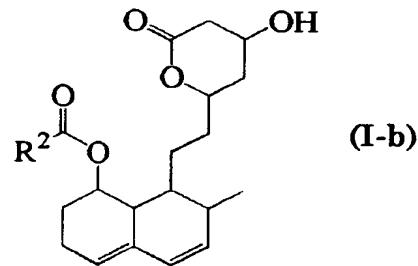
即ち、本願の発明は、以下(1)～(9)に関する。

以下、特に断らない限り、一般式中でR¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す。

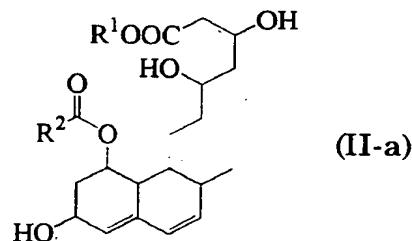
(1) 一般式 (I-a)



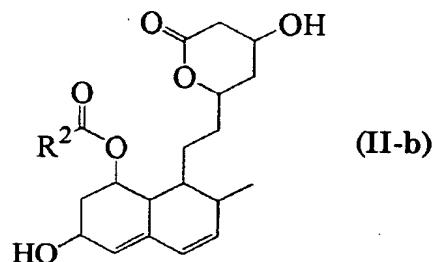
で表される化合物 [以下、化合物(I-a)という] または一般式 (I-b)



で表される、化合物(I-a)のラクトン体 [以下、化合物(I-b)という] から、一般式 (II-a)

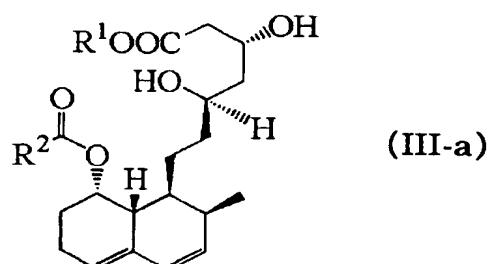


で表される化合物〔以下、化合物(II-a)という〕または一般式(II-b)

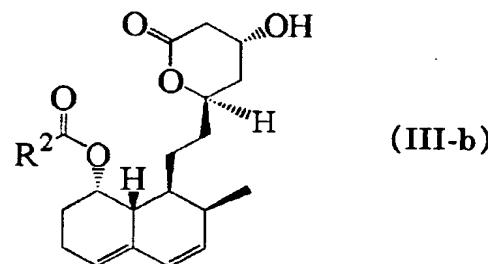


で表される、化合物(II-a)のラクトン体〔以下、化合物(II-b)という〕を生成する活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法。

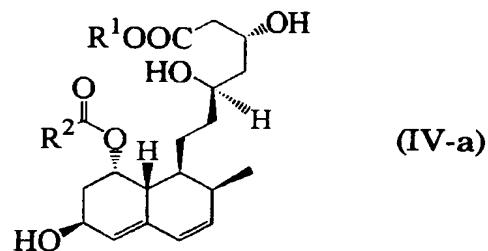
(2) 化合物(I-a)が一般式(III-a)



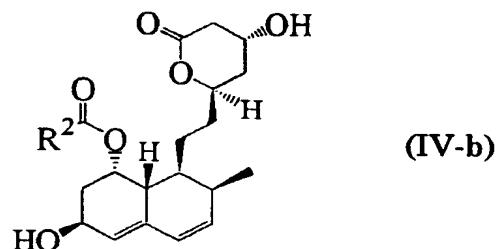
で表される化合物〔以下化合物(III-a)という〕であり、化合物(I-b)が一般式(III-b)



で表される化合物[以下、化合物(III-b)という]であり、化合物(II-a)が一般式(IV-a)

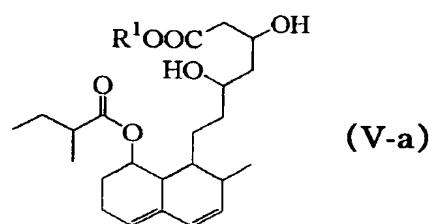


で表される化合物[以下、化合物(IV-a)という]であり、化合物(II-b)が一般式(IV-b)



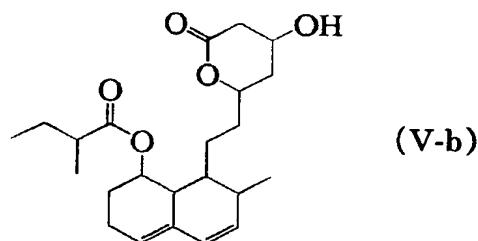
で表される化合物[以下、化合物(IV-b)という]である、上記(1)の製造法。

(3) 化合物(I-a)が一般式(V-a)



で表される化合物[以下、化合物(V-a)という]であり、化合物(I-b)が一般式(V-b)

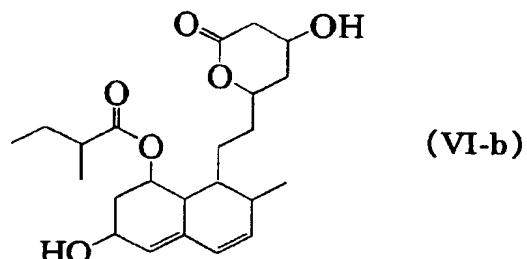
6



で表される化合物[以下、化合物(V-b)という]であり、化合物(II-a)が一般式(VI-a)

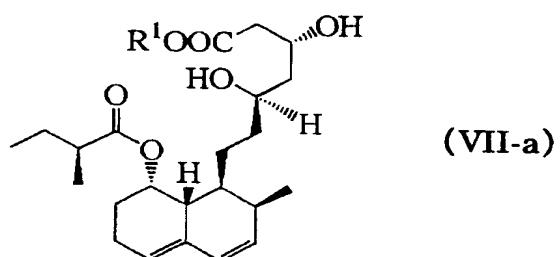


で表される化合物[以下、化合物(VI-a)という]であり、化合物(II-b)が一般式(VI-b)

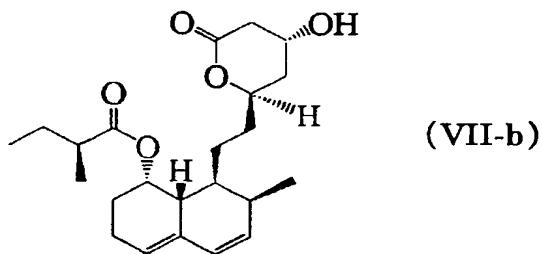


で表される化合物[以下、化合物(VI-b)という]である、上記(1)の製造法。

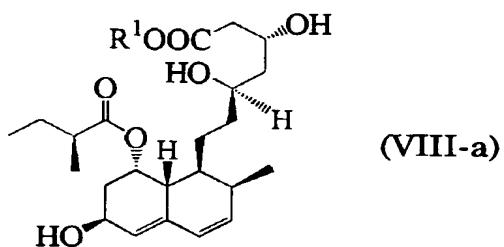
(4) 化合物(I-a)が一般式(VII-a)



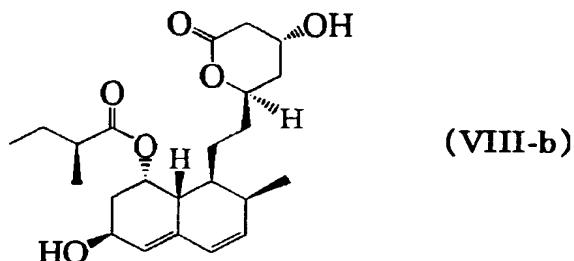
で表される化合物[以下、化合物(VII-a)という]であり、化合物(I-b)が一般式(VII-b)



で表される化合物〔以下、化合物(VII-b)という〕であり、化合物(II-a)が一般式(VIII-a)



で表される化合物〔以下、化合物(VIII-a)という〕であり、化合物(II-b)が一般式(VIII-b)



で表される化合物〔以下、化合物(VIII-b)という〕である、上記(1)の製造法。

(5) 微生物の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、上記(1)の製造法。

(6) 微生物が、Mycobacterium属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Rhodococcus属、Gordona属、Arthrobacter属、Micrococcus属、Cellulomonas属、およびSphingomonas属に属する微生物から選ばれる微生物である、上記(1)の製造法。

(7) 微生物がMycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous、Rhodococcus rhodnii、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Brevibacterium acetylicum、Brevibacterium linens、Brevibacterium incertum、Brevibacterium iodinum、Micrococcus luteus、Micrococcus roseus、Cellulomonas cellulans、Cellulomonas cartae、Sphingomonas paucimobilis、Sphingomonas adhaesiva、およびSphingomonas terraeから選ばれる微生物である、上記(1)の製造法。

(8) 微生物がMycobacterium phlei JCM5865、Mycobacterium smegmatis JCM5866、Mycobacterium thermoresistibile JCM6362、Mycobacterium neoaurum JCM6365、Mycobacterium parafortuitum JCM6367、Mycobacterium gilvum JCM6395、Rhodococcus globerulus ATCC25714、Rhodococcus equi ATCC21387、Rhodococcus equi ATCC7005、Rhodococcus erythropolis ATCC4277、Rhodococcus rhodochrous ATCC21430、Rhodococcus rhodochrous ATCC13808、Rhodococcus rhodnii ATCC35071、Rhodococcus ruber JCM3205、Rhodococcus coprophilus ATCC29080、Rhodococcus fascians ATCC12974、Rhodococcus fascians ATCC35014、Gordona amarae ATCC27808、Gordona rubropertinctus IFM-33、Gordona rubropertinctus ATCC14352、Gordona bronchialis ATCC25592、Gordona sputi ATCC29627、Gordona aichiensis ATCC33611、Gordona terrae ATCC25594、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14020、Corynebacterium glutamicum ATCC19240、Corynebacterium mycetoides ATCC21134、Corynebacterium variabilis ATCC15753、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、

Arthrobacter crystallopoietes ATCC15481、Arthrobacter duodecadis ATCC13347、Arthrobacter ramosus ATCC13727、Arthrobacter sulfureus ATCC19098、Arthrobacter aurescens ATCC13344、Arthrobacter citreus ATCC11624、Arthrobacter globiformis ATCC8010、Brevibacterium acetylicum ATCC953、Brevibacterium linens ATCC19391、Brevibacterium linens ATCC9172、Brevibacterium incertum ATCC8363、Brevibacterium iodinum IF03558、Micrococcus luteus ATCC4698、Micrococcus roseus ATCC186、Cellulomonas cellulans ATCC15921、Cellulomonas cartae ATCC21681、Sphingomonas paucimobilis ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva JCM7370、およびSphingomonas terrae ATCC15098から選ばれる微生物である、上記(1)の製造法。

(9) 微生物がGordona sp. ATCC19067である、上記(1)の製造法。

以下、本願発明を詳細に説明する。

本願発明で用いられる酵素源としては、上記化合物(I-a)または上記化合物(I-b)から、上記化合物(II-a)または上記化合物(II-b)を生成する活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に成育しない微生物、該微生物の培養物、該培養物の処理物があげられる。

アルキルとしては、直鎖または分岐状の、炭素数1～10、好ましくは1～6のアルキルであり、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、これら各種分岐鎖異性体等があげられる。

アリールとしては、フェニル、ナフチル等があげられる。

置換アルキルにおける置換基としては、同一または異なって1～3のハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アリール等があげられる

置換アリールにおける置換基としては、同一または異なって1～3のハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アルコキシ等があげられる。

アルコキシにおけるアルキル部分は上述のアルキルと同義である。

アルカリ金属とは、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、

フランシウムの各元素を表す。

上記微生物としては、例えばMycobacterium属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Rhodococcus属、Gordona属、Arthrobacter属、Micrococcus属、Cellulomonas属、およびSphingomonas属から選ばれる微生物があげられる。

具体的には、Mycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous、Rhodococcus rhodnii、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Brevibacterium acetylicum、Brevibacterium linens、Brevibacterium incertum、Brevibacterium iodinum、Micrococcus luteus、Micrococcus roseus、Cellulomonas cellulans、Cellulomonas cartae、Sphingomonas paucimobilis、Sphingomonas adhaesiva、およびSphingomonas terraeから選ばれる微生物があげられる。

さらに具体的には、Mycobacterium phlei JCM5865、Mycobacterium smegmatis JCM5866、Mycobacterium thermoresistibile JCM6362、Mycobacterium neoaurum JCM6365、Mycobacterium parafortuitum JCM6367、Mycobacterium gilvum JCM6395、Rhodococcus globerulus ATCC25714、Rhodococcus equi ATCC21387、Rhodococcus equi ATCC7005、Rhodococcus erythropolis ATCC4277、Rhodococcus rhodochrous ATCC21430、Rhodococcus rhodochrous ATCC13808、Rhodococcus rhodnii ATCC35071、Rhodococcus ruber JCM3205、Rhodococcus coprophilus ATCC29080、Rhodococcus fascians ATCC12974、Rhodococcus fascians ATCC35014、Gordona amarae ATCC27808、Gordona rubropertinctus IFM-33、Gordona rubropertinctus ATCC14352、Gordona bronchialis ATCC25592、Gordona sputi ATCC29627、Gordona aichiensis ATCC33611、

Gordona terrae ATCC25594、Gordona sp. ATCC19067、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14020、Corynebacterium glutamicum ATCC19240、Corynebacterium mycetoides ATCC21134、Corynebacterium variabilis ATCC15753、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、Arthrobacter crystallopoietes ATCC15481、Arthrobacter duodecadis ATCC13347、Arthrobacter ramosus ATCC13727、Arthrobacter sulfureus ATCC19098、Arthrobacter aurescens ATCC13344、Arthrobacter citreus ATCC11624、Arthrobacter globiformis ATCC8010、Brevibacterium acetylicum ATCC953、Brevibacterium linens ATCC19391、Brevibacterium linens ATCC9172、Brevibacterium incertum ATCC8363、Brevibacterium iodinum IF03558、Micrococcus luteus ATCC4698、Micrococcus roseus ATCC186、Cellulomonas cellulans ATCC15921、Cellulomonas cartae ATCC21681、Sphingomonas paucimobilis ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva JCM7370、Sphingomonas terrae ATCC15098、およびGordona sp. ATCC19067等があげられる。

また、これらの微生物の継代培養体、突然変異体もしくは誘導体、遺伝子組換え技術により製造した組み換え体等も用いられる。

本願発明に用いられる微生物の培養に用いられる培地は、本願発明の微生物が資化することができる炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、本願発明の微生物の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

培地中の炭素源の具体例としては、例えば、グルコース、フラクトース、グリセロール、マルトース、スターチ、サッカロース等の炭水化物、酢酸、クエン酸等の有機酸、糖蜜等があげられる。

窒素源の具体例としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、コーンスティーピリカ、カゼイン加水分解物、大豆ミール、綿実かす、魚ミール、各種発酵菌体およびその消化物等があげられる。

無機物の具体例としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫

酸銅、炭酸カルシウム等があげられる。

また必要に応じてチアミン、ビオチン等のビタミン類、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸、アデニン、グアニン等の核酸関連物質を添加してもよい。

本願発明に用いられる微生物の培養は、振とう培養、通気攪拌培養等の好気的条件下で行なうことが好ましい。通気攪拌培養の場合は、発泡を防ぐため消泡剤を適量添加するのが好ましい。培養は通常20~50°C、好ましくは25~40°Cで、6~120時間行なう。培養中pHは5.0~10.0、好ましくは6.0~8.5に保持する。pH調整は無機酸或いは有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行なう。

このようにして得られる微生物の培養物の処理物としては、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物等があげられる。

化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)への変換方法は、微生物を培養する培地に予め化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法を用いてもよいし、培養中に化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法を用いてもよい。また、酵素源を化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させる方法を用いてもよい。

化合物(I-a)または化合物(I-b)を微生物を培養する培地中に添加する場合、化合物(I-a)または化合物(I-b)は培地1mlあたり0.1~10mg好ましくは0.2~1mgを培養の初発または途中に添加する。化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する際、化合物(I-a)または化合物(I-b)をメチルアルコール、エチルアルコール等の溶媒に溶解して添加してもよい。

酵素源を、化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させる方法を用いる場合、用いる酵素の量は、当該酵素源の比活性等により異なる。例えば、酵素源として微生物の培養物もしくは該培養物の処理物を用いる場合は、酵素源を化合物(I-a)または化合物(I-b)の1mgあたり5~1000mg、好ましくは10~400mg添加する。反応は水性媒体中20~50°Cで行なうことが好ましく、特に25~40°Cで行なうことが好ましい。反応時間は用いる酵素源の量および比活性等により異なるが、通常0.5~150時間、好ましくは1~72時間である。

水性媒体としては、水、リン酸緩衝液、HEPES(N-2ヒドロキシエチルピペラジン-N-エタンスルホン酸)緩衝液、トリス[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン]塩酸緩衝液等の緩衝液があげられる。反応を阻害しなければ該緩衝液に有機溶媒を添加してもよい。有機溶媒としては、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコール、エチルアルコール、ブタノール等があげられる。有機溶媒と水性媒体との混合液は、化合物(I-b)を用いる場合好ましく用いられる。

上記製造方法により、化合物(I-a)から化合物(II-a)または化合物(II-a)と化合物(II-b)の混合物を得ることができる。

また、同様に、化合物(I-b)から化合物(II-b)または化合物(II-a)と化合物(II-b)の混合物を得ることができる。

さらに、化合物(I-a)と化合物(I-b)の混合物から、化合物(II-a)と化合物(II-b)の混合物を得ることもできる。

化合物(I-b)および化合物(II-b)は下記に例示するラクトンの開環方法により、容易に化合物(I-a)および化合物(II-a)にそれぞれ変換することができる。また化合物(I-a)および化合物(II-a)は下記に例示するラクトンの生成方法により、容易に化合物(I-b)および化合物(II-b)にそれぞれ変換することができる。

ラクトンの開環方法としては、化合物(I-b)または化合物(II-b)を水性媒体に溶解し、酸またはアルカリを添加する方法があげられる。水性媒体としては、例えば水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等反応を阻害しない塩類を含む水溶液があげられる。該水溶液中には、反応を阻害しない濃度のメタノール、エタノール、酢酸エチル等の有機溶媒を含んでいてもよい。酸としては酢酸、塩酸、硫酸等の酸が挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等があげられる。

ラクトンの生成方法としては、化合物(I-a)または化合物(II-a)を非水系の溶媒に溶解し、酸または塩基触媒を添加する方法があげられる。非水系の溶媒としては実質的に水を含まない有機溶媒で化合物(I-a)または化合物(II-a)を溶解できるものならばいかなるものでも用いることができる。

非水系の溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、酢酸エチル等があげられる。触媒としては、ラクトン化反応を触媒し、基質や反応産物にラクトン化以外の作用

を及ぼさないものならば、どのようなものでも用いることができる。該触媒としては、例えば、トリフルオロ酢酸やパラトルエンスルホン酸等があげられる。反応温度は特に制限はないが、0～100°Cが好ましく、20～80°Cが特に好ましい。

反応終了後の上記溶液からの化合物(II-a)または化合物(II-b)の採取は、通常の有機合成化学で用いられる方法、例えば、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

本願発明により得られる化合物(II-a)または化合物(II-b)の確認または定量方法は、化合物(II-a)および／または化合物(II-b)を確認または定量できる方法であれば、いずれの方法でも用いられる。例えば、¹³C-NMRスペクトル、¹H-NMRスペクトル、マススペクトル、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の方法により行うことができる。

本発明において、化合物(I-a)、化合物(I-b)、化合物(II-a)および化合物(II-b)の中には、光学異性体等の立体異性体が存在し得るものもあるが、本発明は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

化合物(I-a)としては、化合物(III-a)が好ましく、化合物(V-a)がより好ましく、化合物(VII-a)が特に好ましい。

化合物(I-b)としては、化合物(III-b)が好ましく、化合物(V-b)がより好ましく、化合物(VII-b)が特に好ましい。

化合物(II-a)としては、化合物(IV-a)が好ましく、化合物(VI-a)がより好ましく、化合物(VIII-a)が特に好ましい。

化合物(II-b)としては、化合物(IV-b)が好ましく、化合物(VI-b)がより好ましく、化合物(VIII-b)が特に好ましい。

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1

化合物(VII-b)(シグマ社製) 100mgを9.5mlのメタノールに溶解した後、1 mol/l水酸化ナトリウム0.5mlを加えて室温で1時間振盪した。得られた反応液を乾固し脱イオン水5mlを加えて溶解し1 mol/l塩酸約0.1mlでpHを約6.5～7.5に調整し、さら

に脱イオン水4.9mlを加えることにより最終濃度が10mg/mlの化合物(VII-a)[一般式(VII-a)中R¹がナトリウムである化合物]を10ml得た。

第1および2表に示した各種微生物をそれぞれ寒天培地[ペプトン(極東製薬工業製)1%、肉エキス(極東製薬工業製)0.7%、NaCl 0.3%、酵母エキス(日本製薬社製)0.2%、バクトアガー(ディフコ社製)2%、1mol/l水酸化ナトリウムでpH7.2に調整]に塗布し、第1および2表に表示した各温度で3日間培養した。寒天培地上に生育した菌株各々一白金耳をLB培地[バクトトリプトン(ディフコ社製)1%、バクトイーストエキストラクト(ディフコ社製)0.5%、1mol/l水酸化ナトリウムでpH7.2に調整]3mlを含む試験管に植菌し、第1および2表に示した各温度で24時間振盪培養した。培養後の培養液0.25mlをTB培地[バクトトリプトン(ディフコ社製)1.4%、バクトイーストエキストラクト(ディフコ社製)2.4%、KH₂PO₄ 0.231%、K₂HPO₄ 1.251%、1mol/l水酸化ナトリウムでpH 7.4に調整]5mlを含む試験管に植菌し、第1および2表に示した各温度で24時間振盪培養した。24時間後、上記で得られた化合物(VII-a)を終濃度が0.4mg/mlになるようにそれぞれの試験管に添加し、さらに48時間第1および2表に示した各温度で振盪して反応を行なった。

反応終了後、反応液を酢酸でpH3.5に調整した。この反応液0.5mlに酢酸エチル1mlを加え、1時間振盪した。振盪後、3000rpm、5分間の遠心分離によって反応液を2層に分け、上清の酢酸エチル層を回収し、遠心エバポレーターで溶媒を除去した後、残渣をメタノール0.5mlに溶解した。このメタノール溶液の一部を用いてHPLC分析[カラム; Inertsil ODS-2(5μm, 4x250mm, ジーエルサイエンス社製)、カラム温度; 60°C、移動相; アセトニトリル:水:リン酸=55:45:0.05、流速:0.9ml/分、検出波長:237nm]を行ない、化合物(VIII-a)[一般式(VIII-a)中R¹はナトリウムである化合物]の検出、定量を行なった。結果を第1および第2表に示す。

第 1 表

菌株名		化合物(VIII-a) mg/l	培養温度 (C)
<i>Mycobacterium phlei</i>	JCM 5865	1.6	37
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	JCM 5866	0.4	37
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	JCM 6362	9.1	37
<i>Mycobacterium neoaurum</i>	JCM 6365	3.7	37
<i>Mycobacterium parafortuitum</i>	JCM 6367	7.4	37
<i>Mycobacterium gilvum</i>	JCM 6395	9.6	37
<i>Rhodococcus globerulus</i>	ATCC25714	4.9	28
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC21387	2.5	30
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ATCC4277	1.4	30
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	ATCC21430	4.9	30
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC7005	1.4	30
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	ATCC13808	4.7	28
<i>Rhodococcus rhodni</i>	ATCC35071	0.4	28
<i>Rhodococcus ruber</i>	JCM 3205	0.6	28
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	ATCC29080	5.6	28
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC12974	1.3	28
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC35014	5.2	30
<i>Gordona amarae</i>	ATCC27808	1.2	30
<i>Gordona rubropertinctus</i>	IFM-33	2.5	30
<i>Gordona bronchialis</i>	ATCC25592	0.9	28
<i>Gordona rubropertinctus</i>	ATCC14352	0.7	28
<i>Gordona sputi</i>	ATCC29627	0.3	28
<i>Gordona aichiensis</i>	ATCC33611	0.6	28
<i>Gordona</i> sp.	ATCC19067	4.0	30
<i>Gordona terrae</i>	ATCC25594	0.3	28

第 2 表

菌株名		化合物VIII-a (mg/L)	培養温度 (°C)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC13032	1.1	30
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC14020	0.7	30
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC19240	1.0	30
<i>Corynebacterium mycetoides</i>	ATCC21134	0.3	30
<i>Corynebacterium variabilis</i>	ATCC15753	1.7	30
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ATCC6872	0.6	30
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	ATCC15481	0.5	30
<i>Arthrobacter duodecadis</i>	ATCC13347	0.7	30
<i>Arthrobacter ramosus</i>	ATCC13727	2.2	30
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	ATCC19098	1.1	30
<i>Arthrobacter aurescens</i>	ATCC13344	1.3	30
<i>Arthrobacter citreus</i>	ATCC11624	1.2	30
<i>Arthrobacter globiformis</i>	ATCC8010	0.3	30
<i>Brevibacterium acetylicum</i>	ATCC953	0.4	30
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC19391	0.5	30
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC9172	0.6	30
<i>Brevibacterium incertum</i>	ATCC8363	0.5	30
<i>Brevibacterium iodinum</i>	IFO3558	0.8	30
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC4698	0.5	30
<i>Micrococcus roseus</i>	ATCC186	0.4	30
<i>Cellulomonas cellulans</i>	ATCC15921	0.7	30
<i>Cellulomonas cartae</i>	ATCC21681	0.7	30
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	ATCC29837	3.4	30
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	JCM 7370	2.7	37
<i>Sphingomonas terrae</i>	ATCC15098	3.1	30

実施例 2

Mycobacterium gilvum JCM 6395株を実施例 1 と同様の寒天培地に塗布し、37°Cで3日間培養し、寒天培地上に生育した菌株をLB培地3mlを含む試験管4本に植菌して、37°Cで24時間振盪培養した。この培養液1.25mlを25mlのTB培地を含む300ml容三角フラスコ8本に各々植菌し、37°Cで振盪培養した。24時間後に実施例 1 と同様に調整した化合物(VII-a)[一般式(VII-a)中R¹はナトリウムである化合物]を終濃度が0.4mg/mlになるように添加し、37°Cで48時間振盪した。反応終了後、培養液を3000rpm、4°Cで10分間遠心分離し上清を分取した。この上清液のpHを酢酸で3.5に

調整し、400mlの酢酸エチルを添加して30°Cで1時間振盪した後静置し、上清を回収した。下層の水層に対して同じ操作を繰り返し、得られた酢酸エチル層を先の上清と合わせた。この酢酸エチル層に飽和食塩水100mlを添加して振盪後、上清を回収した。

次にこの上清に無水Na₂SO₄を5g添加して室温で15分間放置後、減圧により酢酸エチルを蒸発させ、乾固した。得られた残渣を脱イオン水5mlに溶解して水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整し、50mlのHP-20カラム(25x100mm、三菱化学社製)に通塔した。カラムは150mlの脱イオン水で洗浄したあと、アセトン含量20%、30%、40%のアセトン水溶液100mlで段階的に溶出した。分取した画分は実施例1と同様のHPLC分析を行い、化合物(VIII-a)を含む画分を回収した。減圧下でこの画分からアセトニトリルを除去し、1mol/l塩酸で溶液のpHを3.0に調整した。この溶液に360mlの酢酸エチルを添加して振盪し、静置後上清を回収した。この上清に飽和食塩水90mlを添加し振盪、静置後、上清を回収した。

次にこの上清に無水Na₂SO₄を4.5g添加して室温で15分間おいた後、減圧乾固した。得られた乾固物をジクロロメタンに溶解し、1%トリフルオロ酢酸を加えてラクトン化した。この反応物を分取用TLC[シリカゲル板；No.1.05744(200x200mm, 0.5mm厚)MERCK社製、展開溶媒；酢酸エチル、発色液；12.5%リンモリブデン酸・1%セリウム/10%硫酸溶液]を用いて分画し、化合物(VIII-b)0.8mgが得られた。得られた化合物(VIII-b)のマススペクトルおよび¹H-NMRスペクトル分析結果は以下の通りである。

マススペクトル

日本電子製JMS-HX/HX110A質量分析計を用い、マトリックスにm-ニトロベンジルアルコールを使用してポジティブモードで測定した。その結果、m/z 407に擬似分子イオンピーク([M+H]⁺)を与え、化合物(II-b)の構造および分子量(406)から期待される数値に一致した。

¹H-NMRスペクトル

日本電子製JNM- α 400型スペクトロメータを用い、重クロロホルム中、内部標準にTMSを使用し400MHzで測定した。その結果を以下に示す。このスペクトルデータは化合物(VIII-b)の公知のデータ[三共研究所年報、37、147(1985)]と一致した。

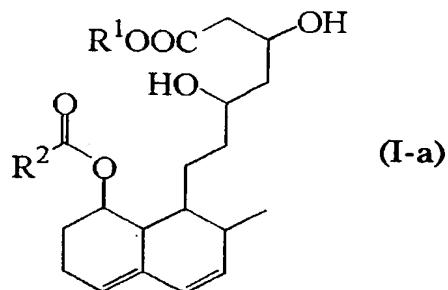
δ ppm(CDCl_3): 6.01(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 5.89(1H, dd, $J=9.5, 5.9\text{Hz}$), 5.58(1H, m), 5.41(1H, m), 4.60(1H, ddd, $J=10.6, 7.3, 5.4, 2.8\text{Hz}$), 4.40(1H, m), 4.38(1H, m), 2.74(1H, dd, $J=13.1, 6.0, 4.8, 1.5\text{Hz}$), 2.40(1H, m), 2.36(1H, m), 2.34(1H, m), 1.95(1H, dddd, $J=14.4, 3.7, 2.9, 1.7\text{Hz}$), 1.86(1H, dddd, $J=12.5, 12.3, 7.3, 4.3\text{Hz}$), 1.69(1H, m), 1.68(1H, m), 1.64(1H, m), 1.57(1H, m), 1.5~1.4(2H, m), 1.43(1H, m), 1.30(1H, m), 1.12(3H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 0.91(3H, d, $J=7.1\text{Hz}$), 0.89(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$)

産業上の利用可能性

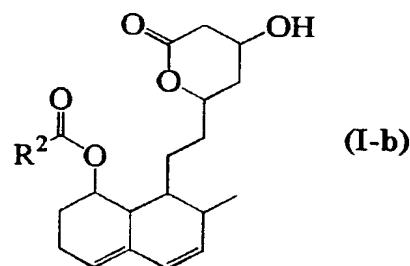
本願発明により HMG-CoA レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を有する化合物を効率よく製造することができる。

請求の範囲

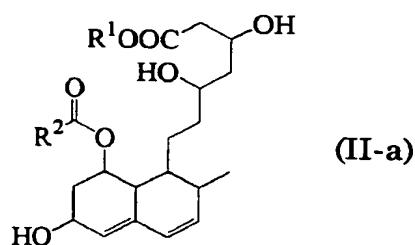
1. 一般式(I-a)



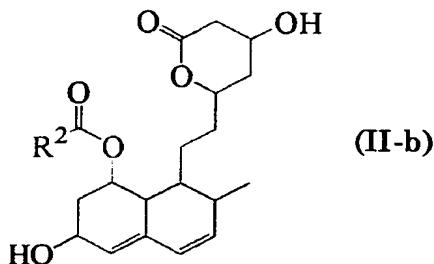
(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物(I-a)という〕または一般式(I-b)



(式中、R²は前記と同義)で表される、化合物(I-a)のラクトン体〔以下、化合物(I-b)という〕から、一般式(II-a)

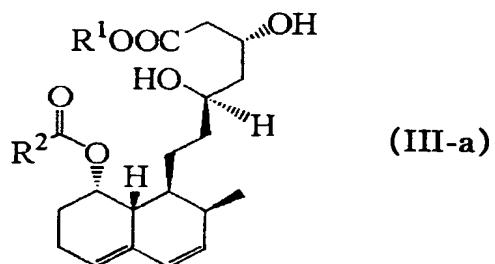


(式中、R¹およびR²は前記と同義)で表される化合物〔以下、化合物(II-a)という〕または一般式(II-b)

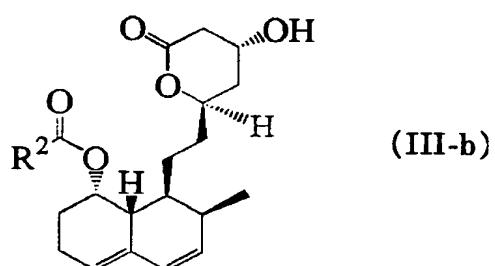


(式中、R²は前記と同義)で表される、化合物(II-a)のラクトン体〔以下、化合物(II-b)という〕を生成する活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法。

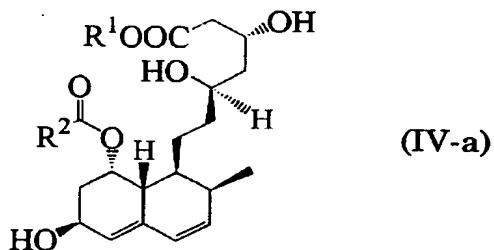
2. 化合物(I-a)が一般式(III-a)



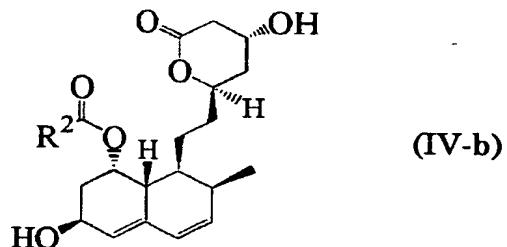
(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)で表される化合物〔以下化合物(III-a)という〕であり、化合物(I-b)が一般式(III-b)



(式中、R²は前記と同義)で表される化合物[以下、化合物(III-b)という]であり、化合物(II-a)が一般式(IV-a)

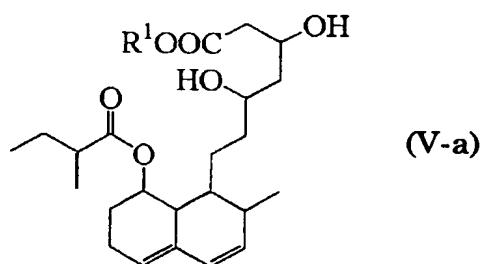


(式中、R¹およびR²は前記と同義)で表される化合物[以下、化合物(IV-a)という]であり、化合物(II-b)が一般式(IV-b)

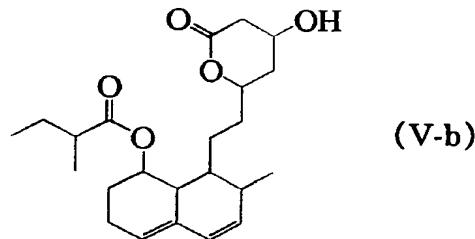


(式中、R²は前記と同義)で表される化合物[以下、化合物(IV-b)という]である、請求項1記載の製造法。

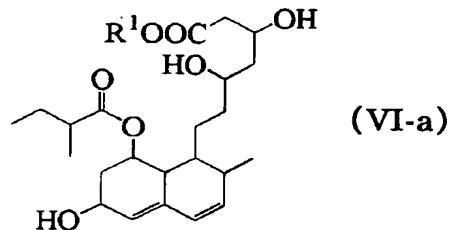
3. 化合物(I-a)が一般式(V-a)



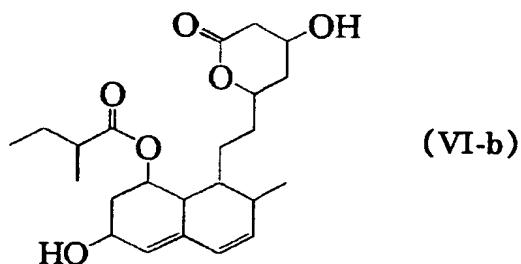
(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物[以下、化合物(V-a)という]であり、化合物(I-b)が一般式(V-b)



で表される化合物[以下、化合物(V-b)という]であり、化合物(II-a)が一般式(VI-a)

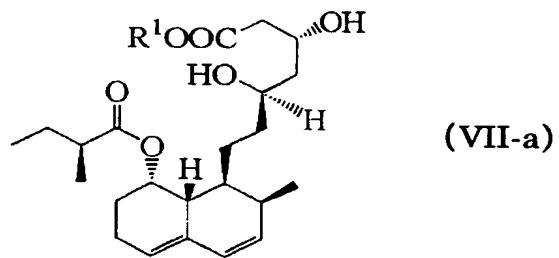


(式中、R'は前記と同義)で表される化合物[以下、化合物(VI-a)という]であり、化合物(II-b)が一般式(VI-b)

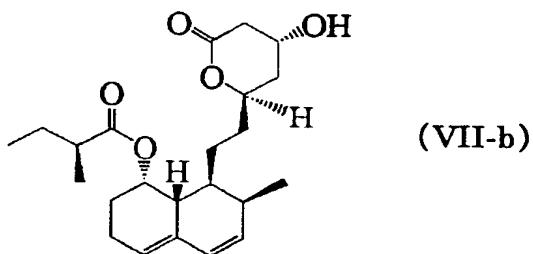


で表される化合物[以下、化合物(VI-b)という]である、請求項1記載の製造法。

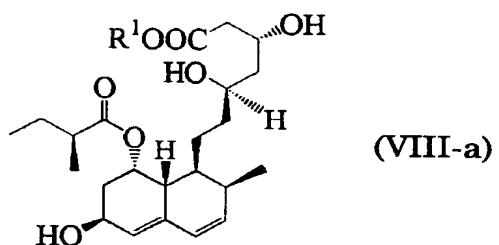
4. 化合物(I-a)が一般式(VII-a)



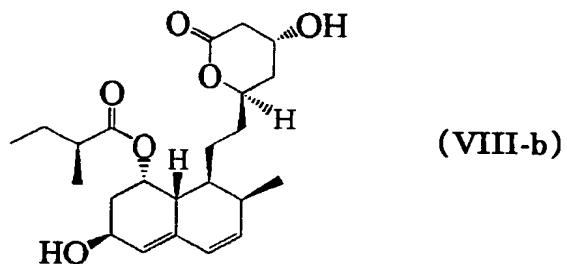
(式中、R'は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物[以下、化合物(VII-a)という]であり、化合物(I-b)が一般式(VII-b)



で表される化合物〔以下、化合物(VII-b)という〕であり、化合物(II-a)が一般式(VIII-a)



(式中、 R^1 は前記と同義)で表される化合物〔以下、化合物(VIII-a)という〕であり、化合物(II-b)が一般式(VIII-b)



で表される化合物〔以下、化合物(VIII-b)という〕である、請求項1記載の製造法。

5. 微生物の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、請求項1記載の製造法。

6. 微生物が、Mycobacterium属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Rhodococcus属、Gordona属、Arthrobacter属、Micrococcus属、Cellulomonas属、およびSphingomonas属に属する微生物から選ばれる微生物である、請求項1記載の製造法。

7. 微生物がMycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous、Rhodococcus rhodnii、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Brevibacterium acetylicum、Brevibacterium linens、Brevibacterium incertum、Brevibacterium iodinum、Micrococcus luteus、Micrococcus roseus、Cellulomonas cellulans、Cellulomonas cartae、Sphingomonas paucimobilis、Sphingomonas adhaesiva、およびSphingomonas terraeから選ばれる微生物である、請求項1記載の製造法。

8. 微生物がMycobacterium phlei JCM5865、Mycobacterium smegmatis JCM5866、Mycobacterium thermoresistibile JCM6362、Mycobacterium neoaurum JCM6365、Mycobacterium parafortuitum JCM6367、Mycobacterium gilvum JCM6395、Rhodococcus globerulus ATCC25714、Rhodococcus equi ATCC21387、Rhodococcus equi ATCC7005、Rhodococcus erythropolis ATCC4277、Rhodococcus rhodochrous ATCC21430、Rhodococcus rhodochrous ATCC13808、Rhodococcus rhodnii ATCC35071、Rhodococcus ruber JCM3205、Rhodococcus coprophilus ATCC29080、Rhodococcus fascians ATCC12974、Rhodococcus fascians ATCC35014、Gordona amarae ATCC27808、Gordona rubropertinctus IFM-33、Gordona rubropertinctus ATCC14352、Gordona bronchialis ATCC25592、Gordona sputi ATCC29627、Gordona aichiensis ATCC33611、Gordona terrae ATCC25594、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14020、Corynebacterium glutamicum ATCC19240、Corynebacterium mycetoides ATCC21134、Corynebacterium variabilis ATCC15753、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、Arthrobacter crystallopoietes

ATCC15481、Arthrobacter duodecadis ATCC13347、Arthrobacter ramosus ATCC13727、
Arthrobacter sulfureus ATCC19098、Arthrobacter aurescens ATCC13344、
Arthrobacter citreus ATCC11624、Arthrobacter globiformis ATCC8010、
Brevibacterium acetylicum ATCC953、Brevibacterium linens ATCC19391、
Brevibacterium linens ATCC9172、Brevibacterium incertum ATCC8363、
Brevibacterium iodinum IF03558、Micrococcus luteus ATCC4698、Micrococcus
roseus ATCC186、Cellulomonas cellulans ATCC15921、Cellulomonas cartae
ATCC21681、Sphingomonas paucimobilis ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva
JCM7370、およびSphingomonas terrae ATCC15098から選ばれる微生物である、請求
項1記載の製造法。

9. 微生物がGordona sp. ATCC19067である、請求項1記載の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P 7/62, C12P 17/06 // (C12P 7/62, C12R 1:32), (C12P 7/62, C12R 1:15), (C12P 7/62, C12R 1:13), (C12P 7/62, C12R 1:01), (C12P 7/62, C12R 1:06), (C12P 7/62, C12R 1:265), (C12P 7/62, C12R 1:34)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P 7/62, C12P 17/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 99/07872, A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 18 February, 1999 (18.02.99) & AU, 9884606, A	1-5
P, X	WO, 99/10499, A1 (GIST-BROCADES BV), 04 March, 1999 (04.03.99) & AU, 9892645, A	1-5
A	SERIZAWA, N. et al. "Biochemical and molecular approaches for production of pravastatin, a potent cholesterol-lowering drug", Biotechnol. Annu. Rev. (1996) Vol.2, p.373-389	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 March, 2000 (21.03.00)

Date of mailing of the international search report
25 April, 2000 (25.04.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 7/62, C12P 17/06 // (C12P 7/62, C12R 1:32), (C12P 7/62, C12R 1:15), (C12P 7/62, C12R 1:13),
(C12P 7/62, C12R 1:01), (C12P 7/62, C12R 1:06), (C12P 7/62, C12R 1:265), (C12P 7/62, C12R 1:34)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 7/62, C12P 17/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/07872, A1 (協和醸酵工業株式会社) 18. 2月. 1999 (18. 02. 99) & AU, 9884606, A	1-5
P, X	WO, 99/10499, A1 (GIST-BROCADES BV) 4. 3月. 1999 (04. 03. 99) & AU, 9892645, A	1-5
A	SERIZAWA, N. et al. "Biochemical and molecular approaches for production of pravastatin, a potent cholesterol-lowering drug", Biotechnol. Annu. Rev. (1996) Vol. 2, p. 373-389	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 03. 00

国際調査報告の発送日

04. 04. 00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 1179	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/00245	国際出願日 (日.月.年) 20.01.00	優先日 (日.月.年) 20.01.99
出願人(氏名又は名称) 協和醸酵工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 7/62, C12P 17/06 // (C12P 7/62, C12R 1:32), (C12P 7/62, C12R 1:15), (C12P 7/62, C12R 1:13),
(C12P 7/62, C12R 1:01), (C12P 7/62, C12R 1:06), (C12P 7/62, C12R 1:265), (C12P 7/62, C12R 1:34)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 7/62, C12P 17/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/07872, A1 (協和醸酵工業株式会社) 18. 2月. 1999 (18. 02. 99) & AU, 9884606, A	1-5
P, X	WO, 99/10499, A1 (GIST-BROCADES BV) 4. 3月. 1999 (04. 03. 99) & AU, 9892645, A	1-5
A	SERIZAWA, N. et al. "Biochemical and molecular approaches for production of pravastatin, a potent cholesterol-lowering drug", Biotechnol. Annu. Rev. (1996) Vol. 2, p. 373-389	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 21. 03. 00	国際調査報告の発送日 04.04.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4 B 9281 

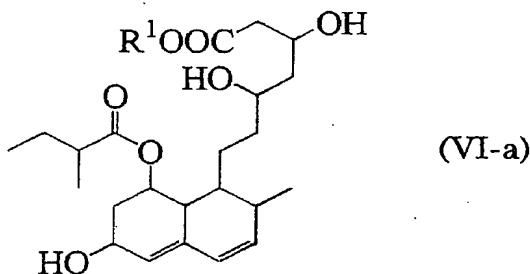
THIS PAGE BLANK (USPTO)

明細書HMG-C_oAレダクターゼ阻害剤の製造法技術分野

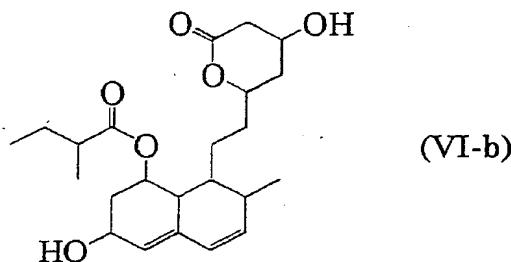
本願発明はヒドロキシメチルグルタリルC_oA(HMG-C_oA)レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物の製造法に関する。

背景技術

一般式(VI-a)



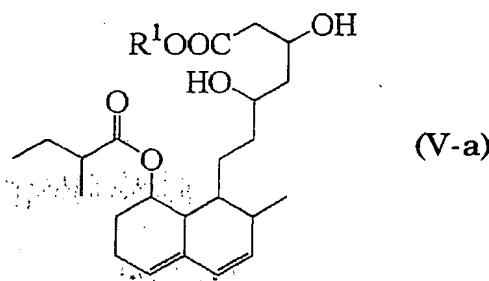
(式中、R¹は水素原子またはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(VI-a)という〕または一般式(VI-b)



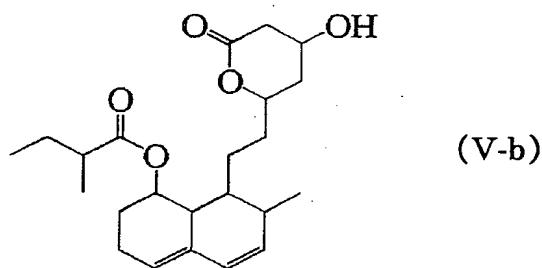
で表される、化合物(VI-a)のラクトン体〔以下、化合物(VI-b)という〕は、HMG-C_oAレダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を示すことが知られている[ザ・ジャーナル・オブ・アンチビオチクス(The Journal of Antibiotics, 29, 1346(1976))]。

微生物によって、一般式(V-a)

THIS PAGE BLANK (USPS10,



(式中、R¹は水素原子またはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(V-a)という〕または一般式(V-b)



で表される、化合物(V-a)のラクトン体〔以下、化合物(V-b)とういう〕から化合物(VI-a)または化合物(VI-b)を生成する方法に関しては既に幾つかの報告がある。

即ち、特開昭57-50894には糸状菌を用いる方法が、特開平7-184670およびWO96/40863には放線菌を用いる方法が、また特許第2672551号には遺伝子組換え放線菌を使用した方法が述べられている。しかし、よく知られているように糸状菌や放線菌は菌糸を伸ばして成長するため、発酵槽で増殖させると培養液の粘度が上昇する。このため培養液中の酸素が不足しやすく、また培養液が不均一になるため反応効率が低下しやすい。この酸素不足を解消し、培養液を均一に保つためには、発酵槽の攪拌速度を上げなければならないが、攪拌速度を上げると菌糸が剪断され、微生物の活性が低下しやすい[発酵工学の基礎、p169~190, P. F. Stansbury, A. Whitaker著、学会出版センター(1988)]。

さらに、上記放線菌および糸状菌はいずれも胞子を形成する能力を有する。胞子は菌体に比べはるかに飛散しやすい上、栄養細胞が容易に死滅するような条件下でも生存できる能力があるため、培養、精製工程での微生物汚染源となりやすい。

発明の開示

本願発明の目的は、HMG-CoAレダクターゼを阻害し、血清コレステロール

THIS PAGE BLANK (USPTO)

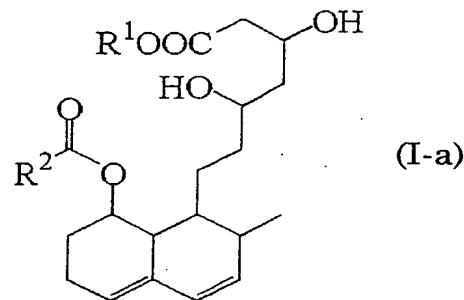
の低下作用等を有する化合物の工業的に有利な製造法を提供することにある。

本願発明者らは、水酸化活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物により化合物(V-a)または化合物(V-b)の水酸化を行うことができれば、胞子飛散による製造工程での微生物汚染や菌糸形成による培養液の不均一化にともなう反応効率の低下等の不都合を回避でき、工業的に有利であると考え、鋭意検討した結果、本願発明を完成するに至った。

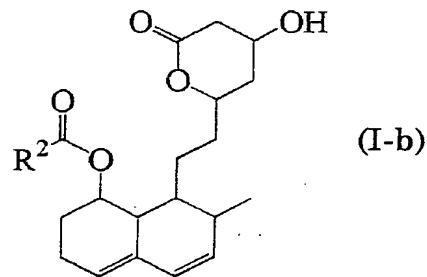
即ち、本願の発明は、以下(1)～(9)に関する。

以下、特に断らない限り、一般式中でR¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す。

(1) 一般式 (I-a)

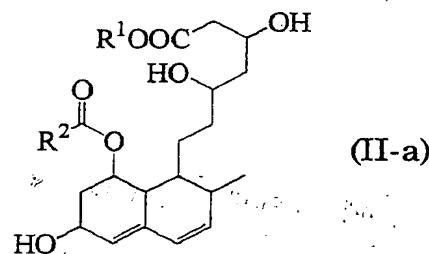


で表される化合物 [以下、化合物 (I-a)という] または一般式 (I-b)

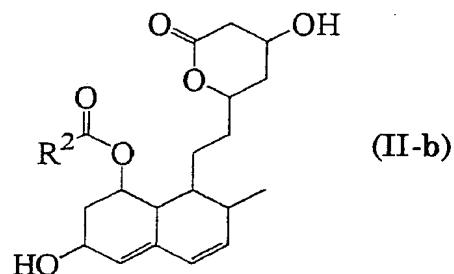


で表される、化合物(I-a)のラクトン体 [以下、化合物(I-b)という] から、一般式 (II-a)

THIS PAGE BLANK (USP10)

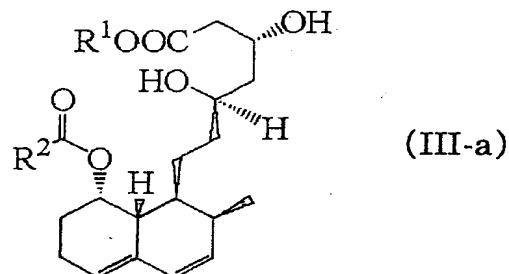


で表される化合物〔以下、化合物(II-a)という〕または一般式(II-b)



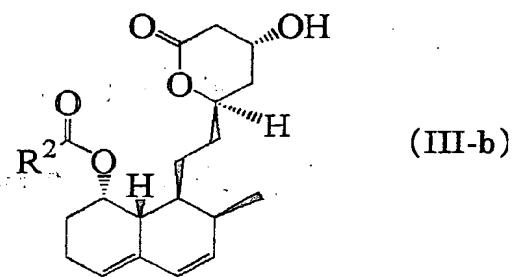
で表される、化合物(II-a)のラクトン体〔以下、化合物(II-b)という〕を生成する活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法。

(2) 化合物(I-a)が一般式(III-a)

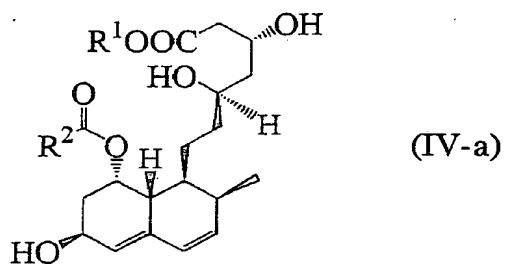


で表される化合物〔以下化合物(III-a)という〕であり、化合物(I-b)が一般式(III-b)

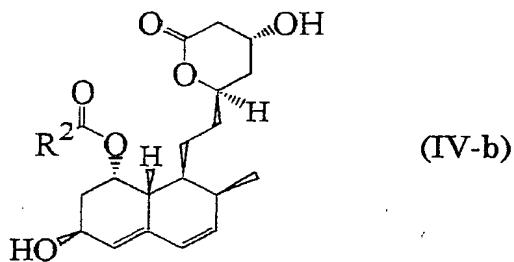
THIS PAGE BLANK (USPTO)



で表される化合物[以下、化合物(III-b)という]であり、化合物(II-a)が一般式(IV-a)

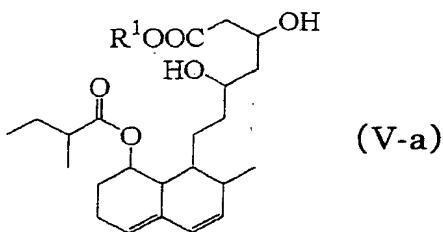


で表される化合物[以下、化合物(IV-a)という]であり、化合物(II-b)が一般式(IV-b)



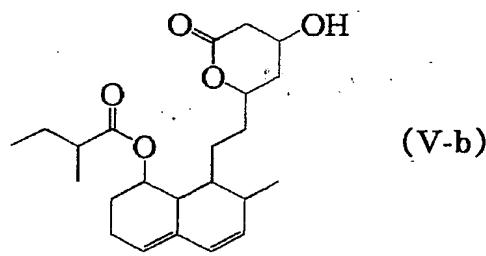
で表される化合物[以下、化合物(IV-b)という]である、上記(1)の製造法。

(3) 化合物(I-a)が一般式(V-a)

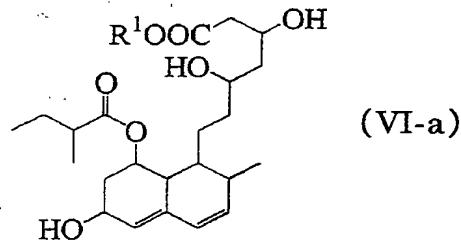


で表される化合物[以下、化合物(V-a)という]であり、化合物(I-b)が一般式(V-b)

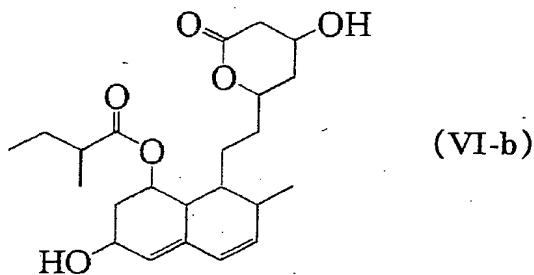
THIS PAGE BLANK (USPTO)



で表される化合物 [以下、化合物(V-b)という] であり、化合物(II-a)が一般式(VI-a)

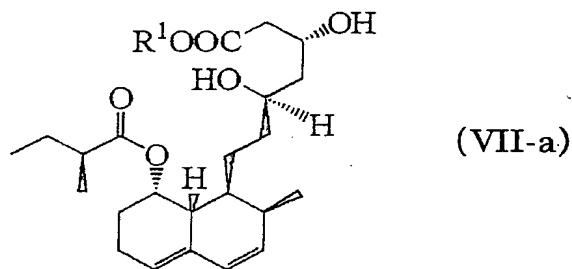


で表される化合物 [以下、化合物(VI-a)という] であり、化合物(II-b)が一般式(VI-b)



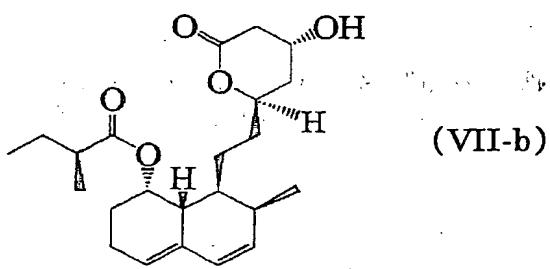
で表される化合物 [以下、化合物(VI-b)という] である、上記(1)の製造法。

(4) 化合物(I-a)が一般式(VII-a)

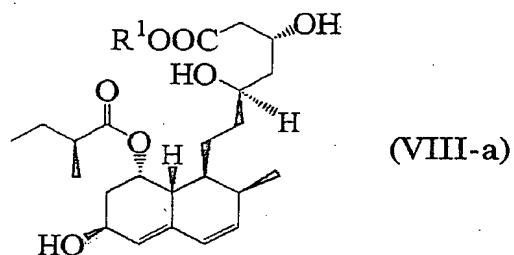


で表される化合物 [以下、化合物(VII-a)という] であり、化合物(I-b)が一般式(VII-b)

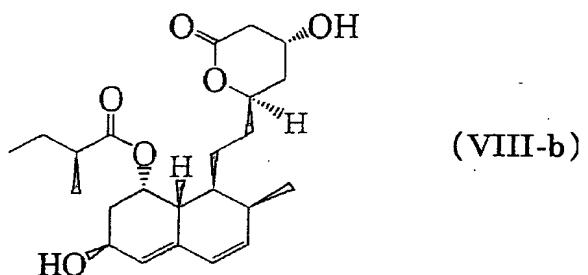
THIS PAGE BLANK (USPTO)



で表される化合物〔以下、化合物(VII-b)という〕であり、化合物(II-a)が一般式(VIII-a)



で表される化合物〔以下、化合物(VIII-a)という〕であり、化合物(II-b)が一般式(VIII-b)



で表される化合物〔以下、化合物(VIII-b)という〕である、上記(1)の製造法。

(5) 微生物の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、上記(1)の製造法。

(6) 微生物が、Mycobacterium属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Rhodococcus属、Gordona属、Arthrobacter属、Micrococcus属、Cellulomonas属、およびSphingomonas属に属する微生物から選ばれる微生物である、上記(1)の製造法。

THIS PAGE BLANK (USP 10)

(7) 微生物が Mycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous、Rhodococcus rhodnii、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Brevibacterium acetylicum、Brevibacterium linens、Brevibacterium incertum、Brevibacterium iodinum、Micrococcus luteus、Micrococcus roseus、Cellulomonas cellulans、Cellulomonas cartae、Sphingomonas paucimobilis、Sphingomonas adhaesiva、および Sphingomonas terrae から選ばれる微生物である、上記(1)の製造法。

(8) 微生物が Mycobacterium phlei JCM5865、Mycobacterium smegmatis JCM5866、Mycobacterium thermoresistibile JCM6362、Mycobacterium neoaurum JCM6365、Mycobacterium parafortuitum JCM6367、Mycobacterium gilvum JCM6395、Rhodococcus globerulus ATCC25714、Rhodococcus equi ATCC21387、Rhodococcus equi ATCC7005、Rhodococcus erythropolis ATCC4277、Rhodococcus rhodochrous ATCC21430、Rhodococcus rhodochrous ATCC13808、Rhodococcus rhodnii ATCC35071、Rhodococcus ruber JCM3205、Rhodococcus coprophilus ATCC29080、Rhodococcus fascians ATCC12974、Rhodococcus fascians ATCC35014、Gordona amarae ATCC27808、Gordona rubropertinctus IFM-33、Gordona rubropertinctus ATCC14352、Gordona bronchialis ATCC25592、Gordona sputi ATCC29627、Gordona aichiensis ATCC33611、Gordona terrae ATCC25594、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14020、Corynebacterium glutamicum ATCC19240、Corynebacterium mycetoides ATCC21134、Corynebacterium variabilis ATCC15753、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Arthrobacter crystallopoietes ATCC15481、Arthrobacter duodecadis ATCC13347、
Arthrobacter ramosus ATCC13727、Arthrobacter sulfureus ATCC19098、
Arthrobacter aurescens ATCC13344、Arthrobacter citreus ATCC11624、
Arthrobacter globiformis ATCC8010、Brevibacterium acetylicum ATCC953、
Brevibacterium linens ATCC19391、Brevibacterium linens ATCC9172、
Brevibacterium incertum ATCC8363、Brevibacterium iodinum IF03558、Micrococcus luteus ATCC4698、Micrococcus roseus ATCC186、Cellulomonas cellulans ATCC15921、Cellulomonas cartae ATCC21681、Sphingomonas paucimobilis ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva JCM7370、およびSphingomonas terrae ATCC15098から選ばれる微生物である、上記(1)の製造法。

(9) 微生物がGordona sp. ATCC19067である、上記(1)の製造法。

以下、本願発明を詳細に説明する。

本願発明で用いられる酵素源としては、上記化合物(I-a)または上記化合物(I-b)から、上記化合物(II-a)または上記化合物(II-b)を生成する活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に成育しない微生物、該微生物の培養物、該培養物の処理物があげられる。

アルキルとしては、直鎖または分岐状の、炭素数1～10、好ましくは1～6のアルキルであり、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、これら各種分岐鎖異性体等があげられる。

アリールとしては、フェニル、ナフチル等があげられる。

置換アルキルにおける置換基としては、同一または異なって1～3のハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アリール等があげられる

置換アリールにおける置換基としては、同一または異なって1～3のハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アルコキシ等があげられる。

アルコキシにおけるアルキル部分は上述のアルキルと同義である。

アルカリ金属とは、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、

THIS PAGE BLANK (USPTO)

フランシウムの各元素を表す。

上記微生物としては、例えばMycobacterium属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Rhodococcus属、Gordona属、Arthrobacter属、Micrococcus属、Cellulomonas属、およびSphingomonas属から選ばれる微生物があげられる。

具体的には、Mycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous、Rhodococcus rhodnii、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Brevibacterium acetylicum、Brevibacterium linens、Brevibacterium incertum、Brevibacterium iodinum、Micrococcus luteus、Micrococcus roseus、Cellulomonas cellulans、Cellulomonas cartae、Sphingomonas paucimobilis、Sphingomonas adhaesiva、およびSphingomonas terraeから選ばれる微生物があげられる。

さらに具体的には、Mycobacterium phlei JCM5865、Mycobacterium smegmatis JCM5866、Mycobacterium thermoresistibile JCM6362、Mycobacterium neoaurum JCM6365、Mycobacterium parafortuitum JCM6367、Mycobacterium gilvum JCM6395、Rhodococcus globerulus ATCC25714、Rhodococcus equi ATCC21387、Rhodococcus equi ATCC7005、Rhodococcus erythropolis ATCC4277、Rhodococcus rhodochrous ATCC21430、Rhodococcus rhodochrous ATCC13808、Rhodococcus rhodnii ATCC35071、Rhodococcus ruber JCM3205、Rhodococcus coprophilus ATCC29080、Rhodococcus fascians ATCC12974、Rhodococcus fascians ATCC35014、Gordona amarae ATCC27808、Gordona rubropertinctus IFM-33、Gordona rubropertinctus ATCC14352、Gordona bronchialis ATCC25592、Gordona sputi ATCC29627、Gordona aichiensis ATCC33611、

THIS PAGE BLANK (USPTO,

Gordona terrae ATCC25594、Gordona sp. ATCC19067、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14020、Corynebacterium glutamicum ATCC19240、Corynebacterium mycetoides ATCC21134、Corynebacterium variabilis ATCC15753、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、Arthrobacter crystallopoietes ATCC15481、Arthrobacter duodecadis ATCC13347、Arthrobacter ramosus ATCC13727、Arthrobacter sulfureus ATCC19098、Arthrobacter aurescens ATCC13344、Arthrobacter citreus ATCC11624、Arthrobacter globiformis ATCC8010、Brevibacterium acetylicum ATCC953、Brevibacterium linens ATCC19391、Brevibacterium linens ATCC9172、Brevibacterium incertum ATCC8363、Brevibacterium iodinum IF03558、Micrococcus luteus ATCC4698、Micrococcus roseus ATCC186、Cellulomonas cellulans ATCC15921、Cellulomonas cartae ATCC21681、Sphingomonas paucimobilis ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva JCM7370、Sphingomonas terrae ATCC15098、およびGordona sp. ATCC19067等があげられる。

また、これらの微生物の継代培養体、突然変異体もしくは誘導体、遺伝子組換え技術により製造した組み換え体等も用いられる。

本願発明に用いられる微生物の培養に用いられる培地は、本願発明の微生物が資化することができる炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、本願発明の微生物の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

培地中の炭素源の具体例としては、例えば、グルコース、フラクトース、グリセロール、マルトース、スターチ、サッカロース等の炭水化物、酢酸、クエン酸等の有機酸、糖蜜等があげられる。

窒素源の具体例としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、コーンスティーピリカー、カゼイン加水分解物、大豆ミール、綿実かす、魚ミール、各種発酵菌体およびその消化物等があげられる。

無機物の具体例としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫

THIS PAGE BLANK (USPTO)

酸銅、炭酸カルシウム等があげられる。

また必要に応じてチアミン、ビオチン等のビタミン類、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸、アデニン、グアニン等の核酸関連物質を添加してもよい。

本願発明に用いられる微生物の培養は、振とう培養、通気攪拌培養等の好気的条件下で行なうことが好ましい。通気攪拌培養の場合は、発泡を防ぐため消泡剤を適量添加するのが好ましい。培養は通常20~50°C、好ましくは25~40°Cで、6~120時間行う。培養中pHは5.0~10.0、好ましくは6.0~8.5に保持する。pH調整は無機酸あるいは有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

このようにして得られる微生物の培養物の処理物としては、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物等があげられる。

化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)への変換方法は、微生物を培養する培地に予め化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法を用いてもよいし、培養中に化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法を用いてもよい。また、酵素源を化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させる方法を用いてもよい。

化合物(I-a)または化合物(I-b)を微生物を培養する培地中に添加する場合、化合物(I-a)または化合物(I-b)は培地1mLあたり0.1~10mg好ましくは0.2~1mgを培養の初発または途中に添加する。化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する際、化合物(I-a)または化合物(I-b)をメチルアルコール、エチルアルコール等の溶媒に溶解して添加してもよい。

酵素源を、化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させる方法を用いる場合、用いる酵素の量は、当該酵素源の比活性等により異なる。例えば、酵素源として微生物の培養物もしくは該培養物の処理物を用いる場合は、酵素源を化合物(I-a)または化合物(I-b)の1mgあたり5~1000mg、好ましくは10~400mg添加する。反応は水性媒体中20~50°Cで行なうことが好ましく、特に25~40°Cで行なうことが好ましい。反応時間は用いる酵素源の量および比活性等により異なるが、通常0.5~150時間、好ましくは1~72時間である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

水性媒体としては、水、リン酸緩衝液、HEPES(N-2ヒドロキシエチルピペラジン-N-エタンスルホン酸)緩衝液、トリス[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン]塩酸緩衝液等の緩衝液があげられる。反応を阻害しなければ該緩衝液に有機溶媒を添加してもよい。有機溶媒としては、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコール、エチルアルコール、ブタノール等があげられる。有機溶媒と水性媒体との混合液は、化合物(I-b)を用いる場合好ましく用いられる。

上記製造方法により、化合物(I-a)から化合物(II-a)または化合物(II-a)と化合物(II-b)の混合物を得ることができる。

また、同様に、化合物(I-b)から化合物(II-b)または化合物(II-a)と化合物(II-b)の混合物を得ることができる。

さらに、化合物(I-a)と化合物(I-b)の混合物から、化合物(II-a)と化合物(II-b)の混合物を得ることもできる。

化合物(I-b)および化合物(II-b)は下記に例示するラクトンの開環方法により、容易に化合物(I-a)および化合物(II-a)にそれぞれ変換することができる。また化合物(I-a)および化合物(II-a)は下記に例示するラクトンの生成方法により、容易に化合物(I-b)および化合物(II-b)にそれぞれ変換することができる。

ラクトンの開環方法としては、化合物(I-b)または化合物(II-b)を水性媒体に溶解し、酸またはアルカリを添加する方法があげられる。水性媒体としては、例えば水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等反応を阻害しない塩類を含む水溶液があげられる。該水溶液中には、反応を阻害しない濃度のメタノール、エタノール、酢酸エチル等の有機溶媒を含んでいてもよい。酸としては酢酸、塩酸、硫酸等の酸が挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等があげられる。

ラクトンの生成方法としては、化合物(I-a)または化合物(II-a)を非水系の溶媒に溶解し、酸または塩基触媒を添加する方法があげられる。非水系の溶媒としては実質的に水を含まない有機溶媒で化合物(I-a)または化合物(II-a)を溶解できるものならばいかなるものでも用いることができる。

非水系の溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、酢酸エチル等があげられる。触媒としては、ラクトン化反応を触媒し、基質や反応産物にラクトン化以外の作用

THIS PAGE BLANK (USPTO)

を及ぼさないものならば、どのようなものでも用いることができる。該触媒としては、例えば、トリフルオロ酢酸やパラトルエンスルホン酸等があげられる。反応温度は特に制限はないが、0~100°Cが好ましく、20~80°Cが特に好ましい。

反応終了後の上記溶液からの化合物(II-a)または化合物(II-b)の採取は、通常の有機合成化学で用いられる方法、例えば、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

本願発明により得られる化合物(II-a)または化合物(II-b)の確認または定量方法は、化合物(II-a)および/または化合物(II-b)を確認または定量できる方法であれば、いずれの方法でも用いられる。例えば、¹³C-NMRスペクトル、¹H-NMRスペクトル、マススペクトル、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の方法により行うことができる。

本発明において、化合物(I-a)、化合物(I-b)、化合物(II-a)および化合物(II-b)の中には、光学異性体等の立体異性体が存在し得るものもあるが、本発明は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

化合物(I-a)としては、化合物(III-a)が好ましく、化合物(V-a)がより好ましく、化合物(VII-a)が特に好ましい。

化合物(I-b)としては、化合物(III-b)が好ましく、化合物(V-b)がより好ましく、化合物(VII-b)が特に好ましい。

化合物(II-a)としては、化合物(IV-a)が好ましく、化合物(VI-a)がより好ましく、化合物(VIII-a)が特に好ましい。

化合物(II-b)としては、化合物(IV-b)が好ましく、化合物(VI-b)がより好ましく、化合物(VIII-b)が特に好ましい。

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1

化合物(VII-b)(シグマ社製) 100mgを9.5mlのメタノールに溶解した後、1mol/l水酸化ナトリウム0.5mlを加えて室温で1時間振盪した。得られた反応液を乾固し脱イオン水5mlを加えて溶解し1mol/l塩酸約0.1mlでpHを約6.5~7.5に調整し、さら

THIS PAGE BLANK (USPTO)

に脱イオン水4.9mlを加えることにより最終濃度が10mg/mlの化合物(VII-a)[一般式(VII-a)中R¹がナトリウムである化合物]を10ml得た。

第1および2表に示した各種微生物をそれぞれ寒天培地[ペプトン(極東製薬工業製)1%、肉エキス(極東製薬工業製)0.7%、NaCl 0.3%、酵母エキス(日本製薬社製)0.2%、バクトアガー(ディフコ社製)2%、1mol/l水酸化ナトリウムでpH7.2に調整]に塗布し、第1および2表に表示した各温度で3日間培養した。寒天培地上に生育した菌株各々一白金耳をLB培地[バクトトリプトン(ディフコ社製)1%、バクトイーストエキストラクト(ディフコ社製)0.5%、1mol/l水酸化ナトリウムでpH7.2に調整]3mlを含む試験管に植菌し、第1および2表に示した各温度で24時間振盪培養した。培養後の培養液0.25mlをTB培地[バクトトリプトン(ディフコ社製)1.4%、バクトイーストエキストラクト(ディフコ社製)2.4%、KH₂PO₄ 0.231%、K₂HP0₄ 1.251%、1mol/l水酸化ナトリウムでpH 7.4に調整]5mlを含む試験管に植菌し、第1および2表に示した各温度で24時間振盪培養した。24時間後、上記で得られた化合物(VII-a)を終濃度が0.4mg/mlになるようにそれぞれの試験管に添加し、さらに48時間第1および2表に示した各温度で振盪して反応を行なった。

反応終了後、反応液を酢酸でpH3.5に調整した。この反応液0.5mlに酢酸エチル1mlを加え、1時間振盪した。振盪後、3000rpm、5分間の遠心分離によって反応液を2層に分け、上清の酢酸エチル層を回収し、遠心エバポレーターで溶媒を除去した後、残渣をメタノール0.5mlに溶解した。このメタノール溶液の一部を用いてHPLC分析[カラム; Inertsil ODS-2(5μm, 4x250mm, ジーエルサイエンス社製)、カラム温度; 60°C、移動相; アセトニトリル:水:リン酸=55:45:0.05、流速:0.9ml/分、検出波長:237nm]を行ない、化合物(VIII-a)[一般式(VIII-a)中R¹はナトリウムである化合物]の検出、定量を行なった。結果を第1および第2表に示す。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 1 表

菌株名		化合物(VIII-a) mg/l	培養温度 (°C)
<i>Mycobacterium phlei</i>	JCM 5865	1.6	37
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	JCM 5866	0.4	37
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	JCM 6362	9.1	37
<i>Mycobacterium neoaurum</i>	JCM 6365	3.7	37
<i>Mycobacterium parafortuitum</i>	JCM 6367	7.4	37
<i>Mycobacterium gilvum</i>	JCM 6395	9.6	37
<i>Rhodococcus globerulus</i>	ATCC25714	4.9	28
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC21387	2.5	30
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ATCC4277	1.4	30
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	ATCC21430	4.9	30
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC7005	1.4	30
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	ATCC13808	4.7	28
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	ATCC35071	0.4	28
<i>Rhodococcus ruber</i>	JCM 3205	0.6	28
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	ATCC29080	5.6	28
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC12974	1.3	28
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC35014	5.2	30
<i>Gordona amarae</i>	ATCC27808	1.2	30
<i>Gordona rubropertinctus</i>	IFM-33	2.5	30
<i>Gordona bronchialis</i>	ATCC25592	0.9	28
<i>Gordona rubropertinctus</i>	ATCC14352	0.7	28
<i>Gordona sputi</i>	ATCC29627	0.3	28
<i>Gordona aichiensis</i>	ATCC33611	0.6	28
<i>Gordona</i> sp.	ATCC19067	4.0	30
<i>Gordona terrae</i>	ATCC25594	0.3	28

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 2 表

菌株名		化合物VIII-a (mg/l)	培養温度 (°C)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC13032	1.1	30
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC14020	0.7	30
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC19240	1.0	30
<i>Corynebacterium mycetoides</i>	ATCC21134	0.3	30
<i>Corynebacterium variabilis</i>	ATCC15753	1.7	30
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ATCC6872	0.6	30
<i>Arthrobacter crystallopoetes</i>	ATCC15481	0.5	30
<i>Arthrobacter duodecadis</i>	ATCC13347	0.7	30
<i>Arthrobacter ramosus</i>	ATCC13727	2.2	30
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	ATCC19098	1.1	30
<i>Arthrobacter aurescens</i>	ATCC13344	1.3	30
<i>Arthrobacter citreus</i>	ATCC11624	1.2	30
<i>Arthrobacter globiformis</i>	ATCC8010	0.3	30
<i>Brevibacterium acetylicum</i>	ATCC953	0.4	30
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC19391	0.5	30
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC9172	0.6	30
<i>Brevibacterium incertum</i>	ATCC8363	0.5	30
<i>Brevibacterium iodinum</i>	IR03558	0.8	30
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC4698	0.5	30
<i>Micrococcus roseus</i>	ATCC186	0.4	30
<i>Cellulomonas cellulans</i>	ATCC15921	0.7	30
<i>Cellulomonas cartae</i>	ATCC21681	0.7	30
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	ATCC29837	3.4	30
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	JCM 7370	2.7	37
<i>Sphingomonas terrae</i>	ATCC15098	3.1	30

実施例 2

Mycobacterium gilvum JCM 6395株を実施例 1 と同様の寒天培地に塗布し、37°Cで3日間培養し、寒天培地上に生育した菌株をLB培地3mlを含む試験管4本に植菌して、37°Cで24時間振盪培養した。この培養液1.25mlを25mlのTB培地を含む300ml容三角フラスコ8本に各々植菌し、37°Cで振盪培養した。24時間後に実施例 1 と同様に調整した化合物(VII-a)[一般式(VII-a)中R¹はナトリウムである化合物]を終濃度が0.4mg/mlになるように添加し、37°Cで48時間振盪した。反応終了後、培養液を3000rpm、4°Cで10分間遠心分離し上清を分取した。この上清液のpHを酢酸で3.5に

THIS PAGE BLANK (USPTO)

調整し、400mlの酢酸エチルを添加して30°Cで1時間振盪した後静置し、上清を回収した。下層の水層に対して同じ操作を繰り返し、得られた酢酸エチル層を先の上清と合わせた。この酢酸エチル層に飽和食塩水100mlを添加して振盪後、上清を回収した。

次にこの上清に無水 Na_2SO_4 を5g添加して室温で15分間放置後、減圧により酢酸エチルを蒸発させ、乾固した。得られた残渣を脱イオン水5mlに溶解して水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整し、50mlのHP-20カラム(25x100mm、三菱化学社製)に通塔した。カラムは150mlの脱イオン水で洗浄したあと、アセトン含量20%、30%、40%のアセトン水溶液100mlで段階的に溶出した。分取した画分は実施例1と同様のHPLC分析を行い、化合物(VIII-a)を含む画分を回収した。減圧下でこの画分からアセトニトリルを除去し、1mol/l塩酸で溶液のpHを3.0に調整した。この溶液に360mlの酢酸エチルを添加して振盪し、静置後上清を回収した。この上清に飽和食塩水90mlを添加し振盪、静置後、上清を回収した。

次にこの上清に無水 Na_2SO_4 を4.5g添加して室温で15分間おいた後、減圧乾固した。得られた乾固物をジクロロメタンに溶解し、1%トリフルオロ酢酸を加えてラクトン化した。この反応物を分取用TLC[シリカゲル板；No.1.05744(200x200mm, 0.5mm厚)MERCK社製、展開溶媒；酢酸エチル、発色液；12.5%リンモリブデン酸・1%セリウム/10%硫酸溶液]を用いて分画し、化合物(VIII-b)0.8mgが得られた。得られた化合物(VIII-b)のマススペクトルおよび¹H-NMRスペクトル分析結果は以下の通りである。

マススペクトル

日本電子製JMS-HX/HX110A質量分析計を用い、マトリックスにm-ニトロベンジルアルコールを使用してポジティブモードで測定した。その結果、m/z 407に擬似分子イオンピーク($[\text{M}+\text{H}]^+$)を与え、化合物(II-b)の構造および分子量(406)から期待される数値に一致した。

¹H-NMRスペクトル

日本電子製JNM- α 400型スペクトロメータを用い、重クロロホルム中、内部標準にTMSを使用し400MHzで測定した。その結果を以下に示す。このスペクトルデータは化合物(VIII-b)の公知のデータ[三共研究所年報、37、147(1985)]と一致した。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

δ ppm(CDCl₃): 6.01(1H, d, J=9.5Hz), 5.89(1H, dd, J=9.5, 5.9Hz), 5.58(1H, m), 5.41(1H, m), 4.60(1H, ddd, J=10.6, 7.3, 5.4, 2.8Hz), 4.40(1H, m), 4.38(1H, m), 2.74(1H, dd, J=13.1, 6.0, 4.8, 1.5Hz), 2.40(1H, m), 2.36(1H, m), 2.34(1H, m), 1.95(1H, dddd, J=14.4, 3.7, 2.9, 1.7Hz), 1.86(1H, dddd, J=12.5, 12.3, 7.3, 4.3Hz), 1.69(1H, m), 1.68(1H, m), 1.64(1H, m), 1.57(1H, m), 1.5~1.4(2H, m), 1.43(1H, m), 1.30(1H, m), 1.12(3H, d, J=6.8Hz), 0.91(3H, d, J=7.1Hz), 0.89(3H, t, J=7.4Hz)

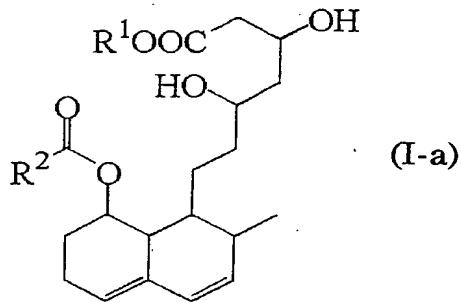
産業上の利用可能性

本願発明により HMG-COA レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を有する化合物を効率よく製造することができる。

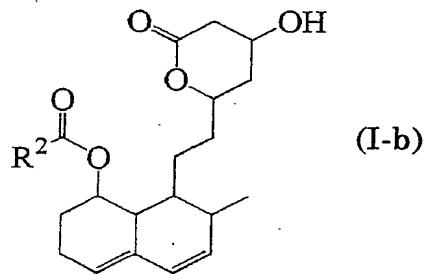
THIS PAGE BLANK (USPTO)

請求の範囲

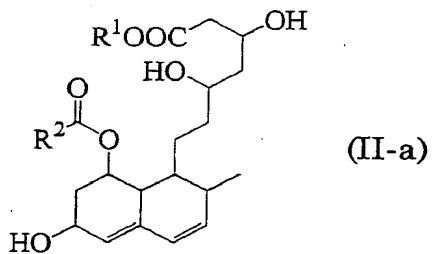
1. 一般式(I-a)



(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物(I-a)という] または一般式(I-b)

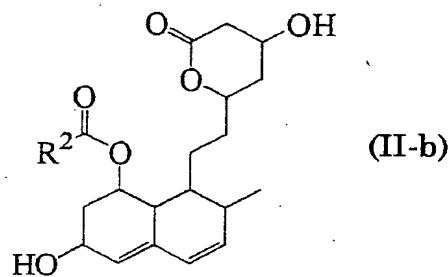


(式中、R²は前記と同義) で表される、化合物(I-a)のラクトン体 [以下、化合物(I-b)という] から、一般式(II-a)



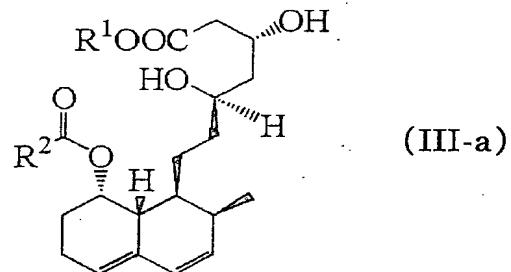
(式中、R¹およびR²は前記と同義) で表される化合物 [以下、化合物(II-a)という] または一般式(II-b)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

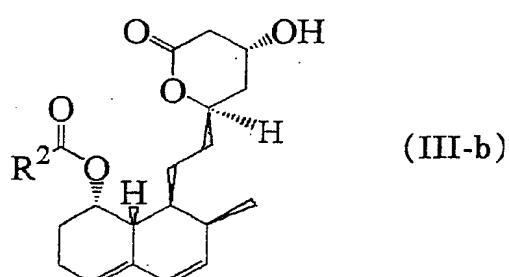


(式中、R²は前記と同義)で表される、化合物(II-a)のラクトン体〔以下、化合物(II-b)という〕を生成する活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法。

2. 化合物(I-a)が一般式(III-a)

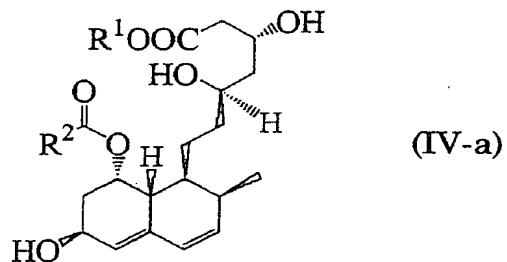


(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)で表される化合物〔以下化合物(III-a)という〕であり、化合物(I-b)が一般式(III-b)

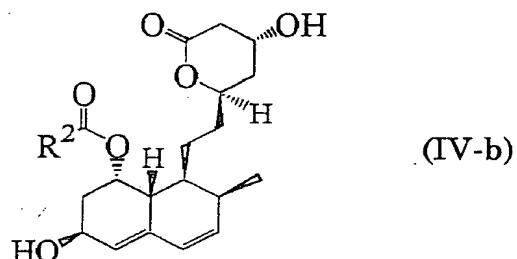


THIS PAGE BLANK (USPTO)

(式中、R²は前記と同義)で表される化合物[以下、化合物(III-b)という]であり、化合物(II-a)が一般式(IV-a)

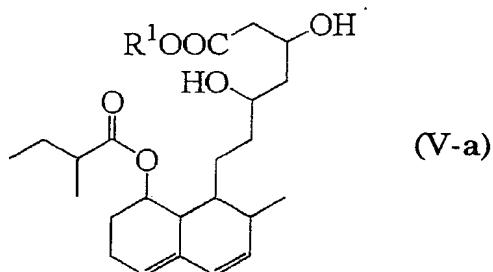


(式中、R¹およびR²は前記と同義)で表される化合物[以下、化合物(IV-a)という]であり、化合物(II-b)が一般式(IV-b)



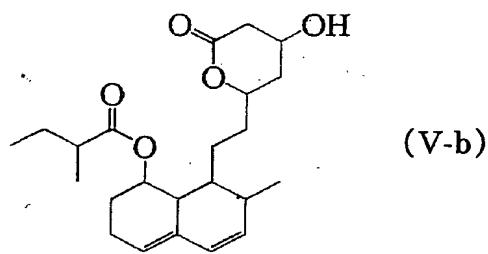
(式中、R²は前記と同義)で表される化合物[以下、化合物(IV-b)という]である、請求項1記載の製造法。

3. 化合物(I-a)が一般式(V-a)

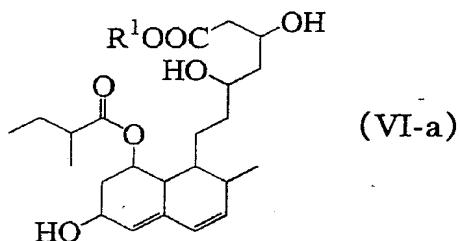


(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物[以下、化合物(V-a)という]であり、化合物(I-b)が一般式(V-b)

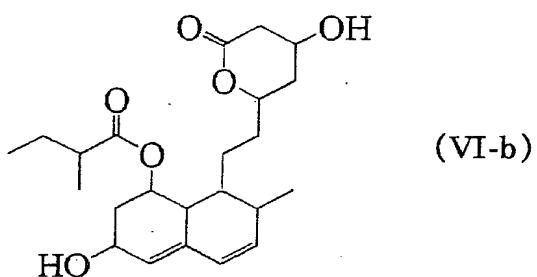
THIS PAGE BLANK (USPTO)



で表される化合物[以下、化合物(V-b)という]であり、化合物(II-a)が一般式(VI-a)

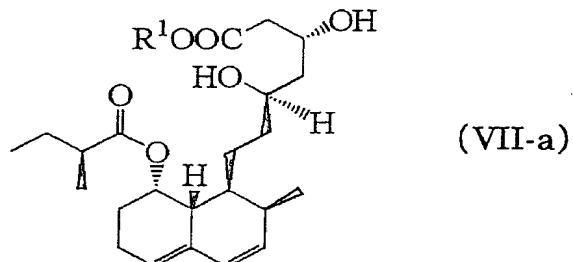


(式中、R¹は前記と同義) で表される化合物 [以下、化合物(VI-a)という] であ
り、化合物(II-b)が一般式(VI-b)



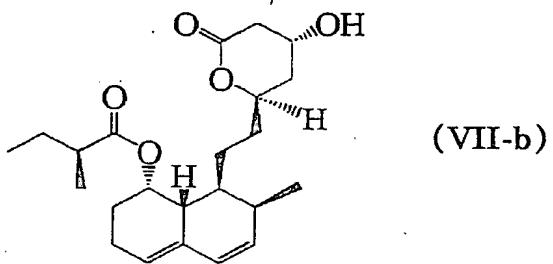
で表される化合物 [以下、化合物(VI-b)という] である、請求項 1 記載の製造法。

4. 化合物(I-a)が一般式(VII-a)

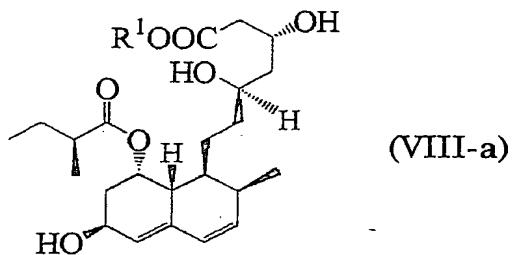


(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表
す) で表される化合物 [以下、化合物(VII-a)という] であり、化合物(I-b)が一般
式(VII-b)

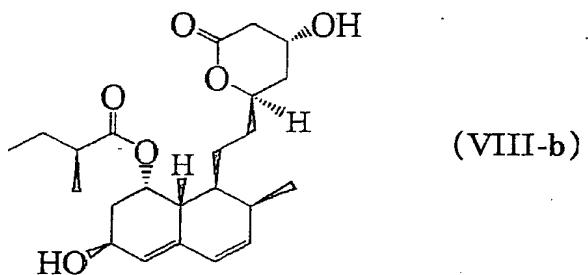
THIS PAGE BLANK (USPTO)



で表される化合物〔以下、化合物(VII-b)という〕であり、化合物(II-a)が一般式(VIII-a)



(式中、R¹は前記と同義)で表される化合物〔以下、化合物(VIII-a)という〕であり、化合物(II-b)が一般式(VIII-b)



で表される化合物〔以下、化合物(VIII-b)という〕である、請求項1記載の製造法。

5. 微生物の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩擦物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、請求項1記載の製造法。

6. 微生物が、Mycobacterium属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Rhodococcus属、Gordona属、Arthrobacter属、Micrococcus属、Cellulomonas属、およびSphingomonas属に属する微生物から選ばれる微生物である、請求項1記載の製造法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. 微生物がMycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous、Rhodococcus rhodnii、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Brevibacterium acetylicum、Brevibacterium linens、Brevibacterium incertum、Brevibacterium iodinum、Micrococcus luteus、Micrococcus roseus、Cellulomonas cellulans、Cellulomonas cartae、Sphingomonas paucimobilis、Sphingomonas adhaesiva、およびSphingomonas terraeから選ばれる微生物である、請求項1記載の製造法。

8. 微生物がMycobacterium phlei JCM5865、Mycobacterium smegmatis JCM5866、Mycobacterium thermoresistibile JCM6362、Mycobacterium neoaurum JCM6365、Mycobacterium parafortuitum JCM6367、Mycobacterium gilvum JCM6395、Rhodococcus globerulus ATCC25714、Rhodococcus equi ATCC21387、Rhodococcus equi ATCC7005、Rhodococcus erythropolis ATCC4277、Rhodococcus rhodochrous ATCC21430、Rhodococcus rhodochrous ATCC13808、Rhodococcus rhodnii ATCC35071、Rhodococcus ruber JCM3205、Rhodococcus coprophilus ATCC29080、Rhodococcus fascians ATCC12974、Rhodococcus fascians ATCC35014、Gordona amarae ATCC27808、Gordona rubropertinctus IFM-33、Gordona rubropertinctus ATCC14352、Gordona bronchialis ATCC25592、Gordona sputi ATCC29627、Gordona aichiensis ATCC33611、Gordona terrae ATCC25594、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14020、Corynebacterium glutamicum ATCC19240、Corynebacterium mycetoides ATCC21134、Corynebacterium variabilis ATCC15753、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、Arthrobacter crystallopoietes

THIS PAGE BLANK (USPTO)

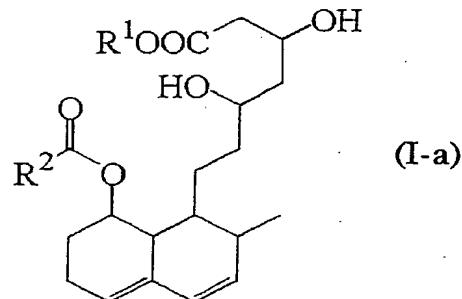
ATCC15481、Arthrobacter duodecadis ATCC13347、Arthrobacter ramosus ATCC13727、
Arthrobacter sulfureus ATCC19098、Arthrobacter aurescens ATCC13344、
Arthrobacter citreus ATCC11624、Arthrobacter globiformis ATCC8010、
Brevibacterium acetylicum ATCC953、Brevibacterium linens ATCC19391、
Brevibacterium linens ATCC9172、Brevibacterium incertum ATCC8363、
Brevibacterium iodinum IF03558、Micrococcus luteus ATCC4698、Micrococcus
roseus ATCC186、Cellulomonas cellulans ATCC15921、Cellulomonas cartae
ATCC21681、Sphingomonas paucimobilis ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva
JCM7370、およびSphingomonas terrae ATCC15098から選ばれる微生物である、請求
項1記載の製造法。

9. 微生物がGordona sp. ATCC19067である、請求項1記載の製造法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

要約書

本願発明は、一般式(I-a)



(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物(I-a)という〕またはその閉鎖ラクトン体〔以下、化合物(I-b)という〕を水酸化する活性を有し、かつ胞子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させ、該水性媒体から化合物(I-a)または化合物(I-b)の水酸化物〔以下、化合物(II-a)または化合物(II-b)という〕を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法に関する。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference 1179
(if desired) (12 characters maximum)

Box No. I TITLE OF INVENTION

PROCESS FOR PRODUCING HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8185 Japan

This person is also inventor.

Telephone No. 03-3282-0036

Facsimile No. 03-3282-1527

Teleprinter No.

State (i.e. country) of nationality:

JAPAN

State (i.e. country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

all designated States

all designated States except the United States of America

the United States of America only

the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

HASHIMOTO Shin-ichi

c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-8533 Japan

This person is:

applicant only

applicant and inventor

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

JAPAN

State (i.e. country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

all designated States

all designated States except the United States of America

the United States of America only

the States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

agent

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

See Notes to the request form

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

YONETANI Yoshiyuki

c/o Tokyo Research Laboratories,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi,
Tokyo 194-8533 JAPAN

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: JAPAN

State (that is, country) of residence: JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

OZAKI Akio

c/o Technical Research Laboratories
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
1-1, Kyowa-cho, Hofu-shi,
Yamaguchi 747-8522 Japan

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

See Notes to the request form

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

AP ARPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT

EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

<input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates	<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho
<input checked="" type="checkbox"/> AL Albania	<input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg
<input checked="" type="checkbox"/> AT Austria	<input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina	<input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norway
<input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input checked="" type="checkbox"/> PL Poland
<input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic	<input checked="" type="checkbox"/> RO Romania
<input checked="" type="checkbox"/> DE Germany	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation
<input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia	<input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spain	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finland	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia
<input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia
<input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan
<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia	<input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey
<input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago
<input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine
<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda
<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America
<input checked="" type="checkbox"/> IN India	
<input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam
<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya	<input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia
<input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan	<input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa
<input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea	
<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan	
<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia	<input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica
<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka	<input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica
<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia	<input checked="" type="checkbox"/> TZ Tanzania
	<input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet

<input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica	<input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco
<input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica	
<input checked="" type="checkbox"/> TZ Tanzania	

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Box No. VI PRIORITY CLAIM

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 20/01/1999	Patent Application 11-12392	JAPAN		
item (2)				
item (3)				

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / JP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request	:	4
description (excluding sequence listing part)	:	19
claims	:	7
abstract	:	1
drawings	:	0
sequence listing part of description	:	0
Total number of sheets:		31

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. fee calculation sheet
2. separate signed power of attorney
3. copy of general power of attorney; reference number, if any
4. statement explaining lack of signature
5. priority document(s) identified in Box No. VI as item(s)
6. translation of international application into (language):
7. separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. other (specify):

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: Japanese

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

HASHIMOTO Shin-ichi OZAKI Akio

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

YONETANI Yoshiyuki

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	<input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / JP	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

See Notes to the request form

THIS PAGE BLANK (USPTO)

This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application.

PCT

FEE CALCULATION SHEET Annex to the Request

For receiving Office use only

International application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's
file reference 1179

Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE 95,000 (T+S) T

2. SEARCH FEE S

International search to be carried out by

(If two or more International Searching Authorities are competent in relation to the international application, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FEE

Basic Fee

The international application contains 31 sheets.

first 30 sheets	46,000	<input type="checkbox"/> b1
1 x 1,100	1,100	<input type="checkbox"/> b2
remaining sheets	additional amount	

Add amounts entered at b1 and b2 and enter total at B 47,100 B

Designation Fees

The international application contains 82 designations.

8 x 9,900	= 79,200	<input type="checkbox"/> D
number of designation fees payable (maximum 11)	amount of designation fee	

Add amounts entered at B and D and enter total at I 126,300 I

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the sum of the amounts entered at B and D.)

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT (if applicable) P

5. TOTAL FEES PAYABLE 221,300

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box

TOTAL

The designation fees are not paid at this time.

MODE OF PAYMENT

authorization to charge deposit account (see below)
 cheque
 postal money order

bank draft
 cash
 revenue stamps

coupons
 other (specify):

DEPOSIT ACCOUNT AUTHORIZATION (this mode of payment may not be available at all receiving Offices)

The RO/ is hereby authorized to charge the total fees indicated above to my deposit account.

is hereby authorized to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above to my deposit account.

is hereby authorized to charge the fee for preparation and transmittal of the priority document to the International Bureau of WIPO to my deposit account.

Deposit Account No.

Date (day/month/year)

Signature

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約に基づく国出願

願書

出願人は、この国出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

受理番号	国出願番号
国出願	
(受付印)	
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	1179

第Ⅰ欄 その他の名稱

HMG-CoAレダクターゼ阻害剤の製造法

第Ⅱ欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

協和醸酵工業株式会社

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan

PCT
20100

文書記載した者は、
発明者である。

電話番号:
03-3282-0036

ファクシミリ番号:
03-3282-1527

加入電信番号:

国籍(国名): 日本国 JP

住所(国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 追記欄に記載した指定国

第Ⅲ欄 その他の出願人又はその他の名稱

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

橋本 信一 HASHIMOTO Shin-ichi

〒194-8533 日本国東京都町田市旭町3丁目6番6号

協和醸酵工業株式会社 東京研究所内

c/o Tokyo Research Laboratories,

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533
Japan

この欄に記載した者は
次に該当する:

出願人のみである。

出願人及び発明者である。

発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JP

住所(国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 追記欄に記載した指定国

その他の出願人又は発明者が統案に記載されている。

第Ⅳ欄 代理人又は共通の代表者、通称のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

代理人 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記欄内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第III 相關の統計 その他の出願人又は発明者

この欄を記載しないときは、この用紙を複数に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

米谷 良之 YONETANI Yoshiyuki
 〒194-8533 日本国東京都町田市旭町3丁目6番6号
 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内
 c/o Tokyo Research Laboratories,
 KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
 6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533
 Japan

この欄に記載した者は、
次に該当する： 出願人のみである。 出願人及び発明者である。 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 JP

住所（国名）： 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

 すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 追記欄に記載した指定国

指定国についての出願人である：

尾崎 明夫 OZAKI Akio
 〒747-8522 日本国山口県防府市協和町1番1号
 協和醸酵工業株式会社 技術研究所内
 c/o Technical Research Laboratories
 KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
 1-1, Kyowa-cho, Hofu-shi, Yamaguchi 747-8522 Japan

この欄に記載した者は、
次に該当する： 出願人のみである。 出願人及び発明者である。 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 JP

住所（国名）： 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

 すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 追記欄に記載した指定国

指定国についての出願人である：

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、
次に該当する： 出願人のみである。 出願人及び発明者である。 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の

 すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 追記欄に記載した指定国

指定国についての出願人である：

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、
次に該当する： 出願人のみである。 出願人及び発明者である。 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の

 すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 追記欄に記載した指定国

指定国についての出願人である：

 その他の出願人又は発明者が他の統計に記載されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第V欄 國の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□に印を付すこと；少なくとも1つの□に印を付すこと）。

△△ 特許協力条約

A P アルギリヤン Gambia, G H ガーナ Ghana, G M ガンビア Gambia, K E ケニア Kenya, L S レソト Lesotho, M W マラウイ Malawi, S D スーダン Sudan, S L ジエラ・レオーネ Sierra Leone, S Z スワジラント Swaziland, U G ウガンダ Uganda, Z W ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラブロトコルと特許協力条約の締約国である他の国

E A ユーラシア 特許協力条約 : A M アルメニア Armenia, A Z アゼルバイジャン Azerbaijan, B Y ベラルーシ Belarus, K G キルギス Kyrgyzstan, K Z カザフスタン Kazakhstan, M D モルドバ Republic of Moldova, R U ロシア Russian Federation, T J タジキスタン Tajikistan, T M トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

E P ヨーロッパ 特許協力条約 : A T オーストリア Austria, B E ベルギー Belgium, C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, C Y キプロス Cyprus, D E ドイツ Germany, D K デンマーク Denmark, E S スペイン Spain, F I フィンランド Finland, F R フランス France, G B 英国 United Kingdom, G R ギリシャ Greece, I E アイルランド Ireland, I T イタリア Italy, L U ルクセンブルグ Luxembourg, M O モナコ Monaco, N L オランダ Netherlands, P T ポルトガル Portugal, S E スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

O A O A P I 特許協力条約 : B F ブルキナ・ファン Burkina Faso, B J ベナン Benin, C F 中央アフリカ Central African Republic, C G コンゴ Congo, C I コートジボアール Côte d'Ivoire, C M カメルーン Cameroon, G A ガボン Gabon, G N ギニア Guinea, G W ギニア・ビサオ Guinea-Bissau, M L マリ Mali, M R モーリタニア Mauritania, N E ニジェール Niger, S N セネガル Senegal, T D チャド Chad, T G トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線に記載する）

△△ 特許協力条約（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線に記載する）

A E アラブ首長国連邦 United Arab Emirates

A L アルバニア Albania

A M アルメニア Armenia

A T オーストリア Austria

A U オーストラリア Australia

A Z アゼルバイジャン Azerbaijan

B A ボスニア・ヘルツェゴビナ Bosnia and Herzegovina

B B バルバドス Barbados

B G ブルガリア Bulgaria

B R ブラジル Brazil

B Y ベラルーシ Belarus

C A カナダ Canada

C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein

C N 中国 China

C U キューバ Cuba

C Z チェコ Czech Republic

D E ドイツ Germany

D K デンマーク Denmark

E E エストニア Estonia

E S スペイン Spain

F I フィンランド Finland

G B 英国 United Kingdom

G D グレナダ Grenada

G E グルジア Georgia

G H ガーナ Ghana

G M ガンビア Gambia

H R クロアチア Croatia

H U ハンガリー Hungary

I D インドネシア Indonesia

I L イスラエル Israel

I N インド India

I S アイスランド Iceland

J P 日本 Japan

K E ケニア Kenya

K G キルギス Kyrgyzstan

K P 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea

K R 韓国 Republic of Korea

K Z カザフスタン Kazakhstan

L C セント・ルシア Saint Lucia

L K スリ・ランカ Sri Lanka

L R リベリア Liberia

L S レソト Lesotho

L T リトアニア Lithuania

L U ルクセンブルグ Luxembourg

L V ラトヴィア Latvia

M D モルドバ Republic of Moldova

M G マダガスカル Madagascar

M K マケドニア旧ユーゴースラヴィア共和国 The former Yugoslavia Republic of Macedonia

M N モンゴル Mongolia

M W マラウイ Malawi

M X メキシコ Mexico

N O ノルウェー Norway

N Z ニュージーランド New Zealand

P L ポーランド Poland

P T ポルトガル Portugal

R O ルーマニア Romania

R U ロシア Russian Federation

S D スーダン Sudan

S E スウェーデン Sweden

S G シンガポール Singapore

S I スロヴェニア Slovenia

S K スロヴァキア Slovakia

S L ジエラ・レオーネ Sierra Leone

T J タジキスタン Tajikistan

T M トルクメニスタン Turkmenistan

T R トルコ Turkey

T T トリニダッド・トバゴ Trinidad and Tobago

U A ウクライナ Ukraine

U G ウガンダ Uganda

U S 米国 United States of America

U Z ウズベキスタン Uzbekistan

V N ヴィエトナム Viet Nam

Y U ユーロースラヴィア Yugoslavia

Z A 南アフリカ共和国 South Africa

Z W ジンバブエ Zimbabwe

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定するためのものである

C R コスタリカ Costa Rica M A モロッコ Morocco

D M ドミニカ Dominica

T Z タンザニア Tanzania

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国（他の国）の指定を行なう。ただし、この宣言から除外する旨の表示を追記欄にした場合は、指定から除外される。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から 15 月が経過する前にその確認がなされない場合は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特許する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から 15 月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載され

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 20. 01. 99	平成11年特許願 第 12392号	日本国 JP		
(2)				
(3)				

上記()の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。 (1)

*先の出願が、A.R.I.P.O.の特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の中なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4、10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII特願 国際調査機関選択欄		先の調査機関の採用言語又は、当該調査機関の言語 (先の調査が国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)		
国際調査機関 (ISA) の選択	出願日 (日、月、年)	出願番号	国名 (又は広域官庁)	
ISA / JP				

第VIII特願 用紙合計欄：提出書類の書類名		この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。	
願書	4枚	1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙	5. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第VI欄の()の番号を記載する）
明細書（配列表を除く）	19枚	2. <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
請求の範囲	7枚	3. <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面	7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
要約書	1枚	4. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状	8. <input type="checkbox"/> ヌクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
図面	0枚	5. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し	9. <input type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する）
明細書の配列表	0枚	6. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書	
合計 31枚			

要約書とともに提示する図面：	本国際出願の使用言語名：日本語
----------------	-----------------

第IX特願 提出出願者の自己名押印欄	
各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。	

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	受理官庁：日本政府	2. 図面
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって		<input type="checkbox"/> 受理された
その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）		<input type="checkbox"/> 不足図面がある
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日		
5. 出願人により特定された 国際調査機関	ISA / JP	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない

記録原本の受理の日	
様式PCT/RO/101 (最終用紙)	(1998年7月：再版1999年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

手数料 1179 月日 系氏
願書附属書

出願人又は代理人の書類記号

1179

受理官庁記入欄	
国際出願番号	
受理官庁の日付印	

出願人

協和醸酵工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 及び 2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）
(送付手数料〔T〕及び調査手数料〔S〕の合計)

95,000 円 T+S

3. 国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 31 枚

最初の30枚まで 46,000 円 b1

1 × 1,100 = 30枚を越える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

1,100 円 b2

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

47,100 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 82

8 × 9,900 = 79,200 円 D

支払うべき指定手数料
の数（上限は10）
(注4)

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入 ······ 126,300 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

221,300 円

合 計

(注1) 送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

(注2) 国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

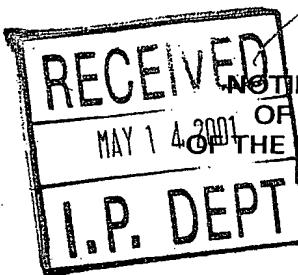
(注3) 調査第V欄でレ印を付した口の数。

(注4) 指定数を記入する。ただし、10指定以上は一律10とする。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY

PCT/HD



PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

Date of mailing (day/month/year)
30 April 2001 (30.04.01)

Applicant's or agent's file reference
1179

International application No.
PCT/JP00/00245

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
20 January 2000 (20.01.00)

Applicant
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP, AT, AU, CA, CH, CN, CZ, FI, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP, EA, AE, AL, AM, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CR, CU, DE, DK, DM, EE, ES, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, PT, SD, SE, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

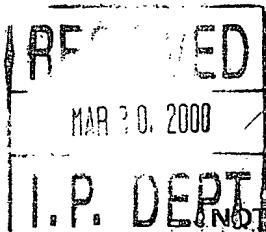
Authorized officer

Elliott Peretti

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY



(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
 6-1, Ohtemachi 1-chome
 Chiyoda-ku
 Tokyo 100-8185
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)	
Applicant's or agent's file reference 1179	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/00245	International filing date (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
20 Janu 1999 (20.01.99)	11/12392	JP	10 Marc 2000 (10.03.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Taïeb Akremi Telephone No. (41-22) 338.83.38
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PARENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year)
27 July 2000 (27.07.00)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Otemachi 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185
JAPON

RECEIVED
AUG - 7, 2000
WPCJD
PLPJD
I.P. DEPT

Applicant's or agent's file reference 1179	IMPORTANT NOTICE	
International application No. PCT/JP00/00245	International filing date (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)	Priority date (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 27 July 2000 (27.07.00) under No. WO 00/43533

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TENT COOPERATION TRE

PCT

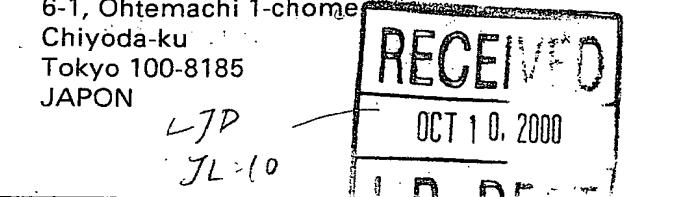
INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Otemachi 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 28 September 2000 (28.09.00)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference 1179			
International application No. PCT/JP00/00245	International filing date (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)	Priority date (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)	
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP :GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National :AU,BG,CA,CN,CZ,DE,IL,JP,KR,MN,NO,NZ,PL,RO,RU,SE,SK,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National :AE,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BR,BY,CH,CR,CU,DK,DM,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,
GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MW,MX,PT,SD,
SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European régional phase is postponed until **31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Diana Nissen

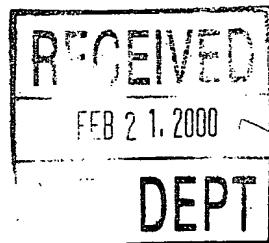
Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT



NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a)).

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Otemachi 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 08 February 2000 (08.02.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1179	International application No. PCT/JP00/00245

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. (for all designated States except US)
HASHIMOTO, Shin-ichi et al (for US)

International filing date : 20 January 2000 (20.01.00)
 Priority date(s) claimed : 20 January 1999 (20.01.99)
 Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 04 February 2000 (04.02.00)
 List of designated Offices :

AP :GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
 EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
 EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
 OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
 National :AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EE,ES,FI,GB,
 GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,
 MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase
- confirmation of precautionary designations
- requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Y. KUWAHARA

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)